

**Aus dem Med. Zentrum für Hygiene und Med. Mikrobiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk  
Institut für Virologie  
Leiter: Prof. Dr. H.-D. Klenk**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR IMMUNOGENITÄT DES  
GENPRODUKTES DES ORF UL142 DES  
HUMANPATHOGENEN CYTOMEGALIEVIRUS**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin**

**Dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt**

**von  
Björn Johannsen  
aus Siegen**

**Marburg 2005**

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am  
16.06.2005 mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Radsak

Correferent: Prof. Dr. Flores de Jacoby

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Klinik der HCMV-Infektion</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie und Krankheitsverläufe	1
1.1.2 Risikopatienten	2
1.1.2.1 Neugeborene	2
1.1.2.2 Immunsupprimierte Transplantatempfänger	3
1.1.2.3 HIV-Patienten	3
1.1.3 Diagnose	4
1.1.3.1 Differentialdiagnosen	4
1.1.3.2 Labordiagnostische Methoden	4
1.1.3 Therapie und prophylaktische Ansätze	5
<b>1.2 Virologische Aspekte</b>	<b>6</b>
1.2.1 Taxonomie	6
1.2.2 Virionstruktur	7
1.2.3 Genomstruktur	8
1.2.4 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese	9
<b>1.3 Unterschiede zwischen attenuierten und wildtypischen(wt)-HCMV-Laborstämmen bzw. klinischen Isolaten</b>	<b>11</b>
1.3.1 Virulenz und Zelltropismus	11
1.3.2 Molekulargenetische Unterschiede	12
<b>2. Problemstellung</b>	<b>14</b>
<b>3. Material</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Bezugsquellen</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Chemikalien</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Antibiotika</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Kulturmediengrundstoffe</b>	<b>17</b>
<b>3.5 Restriktionsendonukleasen</b>	<b>17</b>
<b>3.6 Sonstige Enzyme</b>	<b>17</b>
<b>3.7 Antikörper</b>	<b>17</b>
3.7.1 Gekoppelte Sekundärantikörper	17
3.7.2 Nicht-gekoppelte Sekundärantikörper	18
3.7.3 Polyklonale Antikörper	18
<b>3.8 Sonstige Materialien</b>	<b>19</b>
<b>3.9 Geräte</b>	<b>19</b>
<b>3.10 Medien</b>	<b>20</b>
<b>3.11 Puffer</b>	<b>21</b>
<b>3.12 Zellkulturen</b>	<b>22</b>
3.12.1 Humane Vorhautfibroblasten	22
<b>3.13 Virusstämme</b>	<b>22</b>
<b>3.14 Bakterienstämme</b>	<b>23</b>
3.14.1 E. coli XL1-Blue	23
3.14.2 E. coli M15	23
<b>3.15 Plasmide</b>	<b>23</b>

3.15.1 pcDNA3.1(-)/Myc-His A	23
3.15.2 Der Expressionsvektor pQE-30	24
<b>3.16 Oligonukleotide</b>	<b>25</b>
<b>4. Methoden</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
4.1.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	27
4.1.1.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)	27
4.1.1.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)	27
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	29
4.1.3 Restriktion von Plasmid-DNA mit Endonukleasen	29
4.1.3.1 Analytische Restriktion von DNA	29
4.1.3.2 Präparative Restriktion von DNA	30
4.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	30
4.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
4.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	31
4.1.7 Transformation von <i>E. coli</i>	32
4.1.7.1 Herstellung kompetenter Zellen	32
4.1.7.2 Transformation	33
4.1.8 Herstellung von Glycerinzellen	34
4.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
4.1.9.1 Amplifikation von DNA-Abschnitten durch die PCR	34
4.1.9.2 Reaktionsansatz und -zyklus der PCR	34
4.1.10 DNA-Sequenzierung	36
4.1.10.1 Sequenzierreaktion	36
4.1.10.2 Aufreinigung der Sequenzieransätze	37
4.1.11. Sequenziergel und Elektrophorese	37
<b>4.2 Proteinchemische Methoden</b>	<b>38</b>
4.2.1 <i>In vitro</i> Transkription/Translation	38
4.2.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	39
4.2.2.1 Expression von rekombinanten Proteinen mittels pQE-System	39
4.2.2.2 Aufreinigung von prokaryotisch exprimierten Fusionsproteinen	40
4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
4.2.4 Coomassie Blue-Färbung	43
4.2.5 Autoradiographie	44
<b>4.3 Zellbiologische Methoden</b>	<b>44</b>
4.3.1 Zellkulturtechniken	44
4.3.1.1 Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten	44
4.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von eukariotischen Zellen	45
4.3.2 Virusvermehrung	46
4.3.3 Virusanreicherung	46
4.3.4 Virustitration nach der Endpunktverdünnungsmethode	46
4.3.5 Experimentelle Virusinfektion	47
<b>4.4 Immunologische Methoden</b>	<b>47</b>
4.4.1 Immunisierung und Gewinnung des Immunserums	47
4.4.2 Affinitätsreinigung fragment-spezifischer Antikörpern aus dem Immunserum	48
4.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz	49
4.4.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz nach Methanol/Acetonfixierung	49

4.4.4 Doppelimmunfluoreszenz	50
4.4.5 Adsorption von Immuns serum mit Acetonpräzipitaten aus Zellkulturen	50
4.4.5.1 Herstellung eines Acetonpulvers	50
4.4.5.2 Adsorption des Immuns erums	51
4.4.6 Immunoblot	51
4.4.6.1 Blotten von SDS-Polyacrylamidgelen (Halbtrockenblot)	51
4.4.6.2 Blotten von SDS-Polyacrylamidgelen (Naßblot)	52
4.4.6.3 Immunologischer Proteinnachweis	53
<b>4.5 Computeranalysen</b>	<b>54</b>
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Überprüfung der Glykosylierung des pUL142 mittels <i>in vitro</i> Translation</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Expression und Darstellung des F1-Fragmentes des pUL142</b>	<b>56</b>
5.2.1 Herstellung eines UL142-spezifischen polyklonalen Antikörpers im Kaninchen	56
5.2.2 Subklonierung und Expression der pUL142-Fragmente	57
5.2.2.1 Subklonierung des UL142-F1	57
5.2.2.2 Überprüfung der korrekten Insertion durch Sequenzierung	59
5.2.2.3 Prokaryotische Expression des pUL142-F1	59
5.2.2.4 Überprüfung der Reaktivität des Peptid-Antikörpers mit dem pUL142-F1	61
5.2.2.5 Aufreinigung des pUL142-F1 mittels Ni-NTA Agarose	62
<b>5.3 Etablierung eines Streifenblotverfahrens für die Untersuchung von Patientens eren</b>	<b>64</b>
<b>5.4 Versuche zur fluoreszenzimmunologischen Darstellung UL142-spezifischer Antigene in virusinfizierten humanen Fibroblasten</b>	<b>66</b>
<b>5.5 Testung von Patientens eren auf pUL142-spezifische Antikörper</b>	<b>66</b>
5.5.1 Vergleich von HCMV-negativen und -positiven Seren	66
5.5.2 Untersuchung von Seren von Patienten mit einer HIV-Koinfektion	68
<b>6. Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>82</b>
<b>9.1. Abkürzungen</b>	<b>82</b>
<b>9.2. Buchstabencode der gängigen Aminosäuren</b>	<b>85</b>
<b>9.3. Nukleotidsequenz des UL 142 des HCMV-Stammes Toledo (Cha et al., 1996)</b>	<b>86</b>
<b>9.4. Deduzierte AS-Sequenz des UL 142 des HCMV-Stammes Toledo (Cha et al., 1999)</b>	<b>87</b>
<b>Verzeichnis der Akademischen Lehrer</b>	<b>88</b>
<b>Danksagung</b>	<b>89</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinik der HCMV-Infektion

### 1.1.1 Epidemiologie und Krankheitsverläufe

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ein Vertreter der Herpesviren und weltweit als Infektionserreger verbreitet. Der Mensch stellt als Infektionsquelle das einzige Reservoir für das Virus dar. Der Grad der Durchseuchung steht im engen Zusammenhang mit sozialen und ökonomischen Gegebenheiten (Krech, 1973, Britt, Alford, 1996; Kumar, Nankervis, 1979). So besteht in den westlichen Industrieländern unter der Erwachsenenpopulation eine Durchseuchungsrate von 40-70 %. Bei Kindern und Jugendlichen bis zum 20. Lebensjahr liegt diese bei 20 %. Aufgrund der hygienischen und sozialen Gegebenheiten in den sogenannten Entwicklungsländern Afrikas und Asiens weisen hier bereits 100 % der Kinder Antikörper gegen HCMV auf (Britt, Alford, 1996). Der Grad der Durchseuchung ist dort somit deutlich höher.

Die horizontale Übertragung des Virus erfolgt durch Speichel über die Schleimhäute, über Spermaflüssigkeit, Vaginalsekret und Urin. Daneben kann die Infektion auch vertikal transplazentar auf den Fötus (kongenitale Infektion) oder peri- und postnatal auf den Säugling durch Vaginalsekrete und virushaltige Muttermilch übertragen werden. Auf iatrogenem Wege besteht die Möglichkeit der Übertragung durch zellhaltige Bluttransfusionen, Knochenmarktransplantationen und Spenderorgane, wobei im Falle von Organempfängern der medikamentösen Immunsuppression eine besondere Bedeutung zukommen kann (Fishman, Rubin, 1998).

Bei einer Primärinfektion, nach einer Inkubationszeit von 2-10 Wochen, kann es beim gesunden, immunkompetenten Menschen zur Ausbildung einer katarrhalischen Symptomatik mit Tonsillitis und/oder Pharyngitis, erhöhter Temperatur, Anstieg der Lymphozytenzahl im Blut und gegebenenfalls Splenohepatomegalie – ähnlich dem durch das Epstein-Barr-Virus verursachten Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose – kommen (Mandell et al, 1995). Die Primärinfektion kann aber auch asymptomatisch verlaufen. In dieser Phase ist eine Virämie zu beobachten, in der der Infizierte zum Ausscheider des Virus wird. Sowohl der symptomlose, infizierte Patient wie auch der erkrankte Patient kann das Virus ausscheiden. Grund für diese

Virusausscheidung ist die vornehmliche Vermehrung des Virus in den Gangepithelien der Speicheldrüsen, aber auch den Genitalorganen sowie der Epithelauskleidung der Nierengänge. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus, von gelegentlichen Phasen der Reaktivierung mit erneuter Virusausscheidung unterbrochen, lebenslang latent im Organismus. Bei kongenital infizierten Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten führt das HCMV in Folge einer Primärinfektion oder auch Reaktivierung zu unterschiedlich ausgeprägten und zum Teil letalen Krankheitsverläufen. Die Pathogenese im Einzelnen ist bisher nur teilweise erklärbar.

### **1.1.2 Risikopatienten**

#### *1.1.2.1 Neugeborene*

Die vertikale Übertragung kann prä-, peri- und postnatal erfolgen (s. 1.1.1). Wichtig für den Verlauf der Erkrankung ist der Zeitpunkt der Infektion. In der Regel gelangt das Virus im Falle der pränatalen Infektion durch seine Assoziation mit monozytären Zellen über den mütterlichen Kreislauf in die Plazenta. Hier repliziert es in Fibroblasten, Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten, um im Anschluss über die Nabelschnur in den fetalen Kreislauf zu gelangen (Hemmings et al., 1998; Fisher et al., 2000).

Etwa 1 % der Neugeborenen ist mit HCMV infiziert (De Jong, 1998). Das bedeutet, dass bei etwa 800000 Geburten in der Bundesrepublik Deutschland jährlich etwa 8000 Kinder mit einer HCMV-Infektion zur Welt kommen. Bei diesen infizierten Kindern kommt es in etwa 10 % der Fälle (ca. 600-800 Kinder) zur Ausbildung bleibender Schäden (R. Pass, Fields, 2000). Dies sind vornehmlich zerebrale Schäden (Lipitz et al., 2002) in Form von Lernbehinderungen sowie Hörbehinderungen und Wachstumsstörungen.

Auch die bei Geburt klinisch unauffälligen, infizierten Neugeborenen entwickeln in bis zu 10 % Spätschäden.

Im Rahmen der perinatalen Infektion wird das Virus während der Geburt durch virushaltige Cervix- und Vaginalsekrete auf den Säugling übertragen. Der Verlauf der perinatalen Infektion ist vergleichbar mit der postnatalen Infektion.

Bei der postnatalen Infektion wird das Virus durch die seropositive Mutter am häufigsten über die Muttermilch, aber auch durch Kontaktinfektion auf das Neugeborene übertragen. Diese postnatale Infektion ist bezüglich des Erscheinungsbildes mit der Primärinfektion des immunkompetenten Erwachsenen

vergleichbar, sofern es sich bei dem Säugling nicht um ein Frühgeborenes handelt. Ab einem Gewicht von etwa 1500 g kommt es wie beim Erwachsenen zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild (s. 1.1.1), wobei die Neugeborenen häufiger zu Hepatosplenomegalie, seltener jedoch zu Fieber neigen als Erwachsene im Rahmen des Primärinfektes (Pannuti et al., 1985).

#### *1.1.2.2 Immunsupprimierte Transplantatempfänger*

Bei medikamentös immunsupprimierten Patienten, beispielweise Organ- und Knochenmarkstransplantatempfänger oder Patienten mit medikamentös behandelten Autoimmunerkrankungen, können HCMV-Infektionen zu lebensbedrohlichen Zuständen führen. Die HCMV-Erkrankung ist eine der häufigsten opportunistischen Erkrankungen, welche die Behandlung immunsupprimierter Patienten kompliziert. Die mit einer hohen Morbidität und Mortalität auftretende Infektion erfolgt durch Primärinfektion oder Reaktivierung des latenten Virus oder Reinfektion nach vorangegangener Infektion und kann zu Retinitis, Enzephalitis, Pneumonitis, Hepatitis, gastrointestinalen Ulzerationen und kutanen Läsionen (Petechien) führen (Hinkle et al., 2000). Bei Organempfängern kann es nicht nur zu Infektionen und Dysfunktionen des transplantierten Organs kommen, sondern auch zur Abstoßungsreaktion (Grattan et al., 1989). Bei Komplikationen nach Knochenmarktransplantation ist HCMV eine der häufigsten Todesursachen (Meyers, 1989).

#### *1.1.2.3 HIV-Patienten*

Da HIV-infizierte Personen meist auch für HCMV seropositiv sind, erkranken sie bei fortschreitender Immundefizienz selten an einer Primärinfektion durch HCMV, sondern häufiger durch eine Reaktivierung des latent persistierenden Virus. Es wird diskutiert, ob eine Koinfektion mit HCMV ein rascheres Fortschreiten der HIV-Viruslast bedingt (Kovacs et al., 1999).

Häufige Manifestationen sind die HCMV-induzierte Retinitis, Meningitis, Enzephalitis und Gastroenteritis. Als häufigste Todesursache (20-30 %) ist die durch HCMV verursachte atypische interstitielle Pneumonitis zu nennen.



### 1.1.3 Diagnose

#### 1.1.3.1 Differentialdiagnosen

Bei Transplantatempfängern ist die Symptomatik einer Cytomegalieinfektion als eher unspezifisch zu bezeichnen. Die Symptome wie Enteritis, Pneumonitis oder fieberige Zustände können auf eine Vielzahl viraler (EBV und HHV6) und nicht viraler Infektionen zurück zu führen sein.

Ebenso sind die Symptome einer konnatalen Cytomegalieinfektion beim Neugeborenen unspezifisch. Hier ist die HCMV-Erkrankung gegen infektiöse (Röteln, Syphilis) wie auch nicht infektiöse systemische Erkrankungen abzugrenzen (Osteopetrosis, Erythroblastosis fetalis), die mit einem in Teilbereichen ähnlichen Krankheitsbild einhergehen.

Erkrankungen bei AIDS-Patienten sind typischerweise Retinitis, Gastroenteritis oder Oesophagitis, die jedoch auch andere viral, bakteriell und fungal bedingte Ursachen haben können (Pass R, 2000).

#### 1.1.3.2 Labordiagnostische Methoden

Die diagnostischen Methoden bei Verdacht auf eine Cytomegalie-assoziierte Erkrankung und zum Nachweis einer bestehenden HCMV-Infektion beinhalten heute für den direkten Virusnachweis die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), und die Bestimmung des viralen pp65 Antigens in Leukozyten (de Jong et al., 1998), sowie für den indirekten Nachweis etablierte serologische Methoden.

Als sehr sensitive Methode ist weiterhin die Virusanzüchtung in permissiven Kulturzellen aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin und Speichel zu nennen. Sie stellt eine spezifische, aber auch zeitaufwändige Nachweis-Methode dar, da der charakteristische cytopathische Effekt (CPE) sich erst nach Tagen bis Wochen einstellt (Yen-Liebermann, 2000).

Der indirekte serologischen Nachweis (z.B. Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA), Immunoblot (IB)) beinhaltet das Testen auf HCMV-spezifische Immunglobuline (IgG und IgM) und setzt eine bereits erfolgte positive Immunreaktion voraus (v.d. Meer et al., 1998).

Ein sensitives und spezifisches Verfahren zur Erkennung einer floriden virämischen HCMV-Infektion ist der sogenannte pp65-Antigen-Test (Van der Bij et al., 1988). Der Test dient dem Nachweis eines spezifischen HCMV-Genprodukts (pUL83; pp65), das

während der akuten HCMV-Infektion vornehmlich bei Immunsupprimierten im Kern granulozytärer Blutleukozyten nachweisbar ist. Der pp65-Antigen-Nachweis erfolgt mittels spezifischer monoklonaler Antikörper und bietet den Vorteil der Quantifizierung, was eine Überwachung der HCMV-Aktivität bzw. der Effizienz einer antiviralen Therapie zulässt.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Detektion viraler DNA in Geweben, Leukozyten, Plasma, Liquor, broncho-alveolarer Flüssigkeit und Urin (Smith, Dunstan, 1993). Dieser Nachweis ist abhängig von der Detektionsmethode sowohl qualitativ als auch quantitativ durchführbar.

### **1.1.3 Therapie und prophylaktische Ansätze**

Als antivirales Chemotherapeutikum steht Ganciclovir (9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin) zur Verfügung. Es wird durch eine viruseigene Kinase (pUL97) in den infizierten Zellen aktiviert (Sullivan et al., 1992) und wirkt als Inhibitor der viralen DNA-Polymerase (Matthews, Boehme, 1988, Oram, Herold, 1998). Foscarnet (Phosphonoameisensäure) oder Cidofovir (ein Nukleotidanalogen) sind alternative Medikamente, allerdings aufgrund ihrer starken Toxizität nur bedingt geeignet. Darüber hinaus sind bereits Resistenzentwicklungen gegen alle drei der genannten Wirkstoffe beschrieben worden (Mascolini, 1996).

Ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht. Es wurden in der Vergangenheit Lebendimpfstoffe auf der Basis der attenuierten Laborstämme Towne und AD169 an Transplantierten getestet, die jedoch keinen ausreichenden Schutz gegen Überinfektionen boten (Adler et al., 1995; Plotkin et al., 1990). Neue Strategien beinhalten die Entwicklung sogenannter Teilvakzinen, die rekombinante HCMV-Hüllmembran- oder Matrixproteine, z.B. gB, pp65 oder gH enthalten oder die Verwendung von in Vektoren inserierten HCMV-Genen (Plotkin, 2001). Der Wert dieser neuen Generation von Impfstoffen muss abgewartet werden.

## 1.2 Virologische Aspekte

### 1.2.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist entsprechend der Klassifikation des „Internationalen Komitees für Virustaxonomie“ (ICTV) ein Mitglied der Familie der Herpesviridae (Roizman et al., 1992). Es besitzt, wie alle Herpesviren ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom. Dieses ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das sich innerhalb einer amorphen Proteinmatrix, dem Tegument, befindet. Dieses wird von einer Hüllmembran eingeschlossen, die die viralen Glykoproteine enthält.

Die Familie der Herpesviren umfasst mehr als 100 beschriebene Spezies mit acht humanpathogenen Vertretern. Die Vertreter dieser Familie lassen sich aufgrund ihrer Pathogenität, ihres Wirtsspektrums, der Dauer ihres Replikationszyklus, der Cytopathologie und des Zelltropismus in drei Unterfamilien gliedern, den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviridae. Typischerweise persistieren alle Herpesviren nach Erstinfektion latent im Körper.

<i>Subfamilie</i>	<i>Synonym</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Literatur</i>
<b><math>\alpha</math>-Herpesviridae</b>	Herpes simplex Virus 1 ( <i>Humanes Herpesvirus 1</i> )	HSV 1, <i>HHV 1</i>	(Gruter, 1924)
	Herpes Simplex Virus 2 ( <i>Humanes Herpesvirus 2</i> )	HSV 2, <i>HHV 2</i>	(Schneeweis, 1962)
	Varizella-Zoster Virus ( <i>Humanes Herpesvirus 3</i> )	VZV, <i>HHV 3</i>	(Dumas et al., 1981)
<b><math>\beta</math>-Herpesviridae</b>	Humanes Cytomegalie Virus ( <i>Humanes Herpesvirus 5</i> )	HCMV, <i>HHV 5</i>	(Smith, 1956)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV 6	(Lindquister et al., 1991)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV 7	(Frenkel et al., 1990)
<b><math>\gamma</math>-Herpesviridae</b>	Epstein-Barr Virus ( <i>Humanes Herpesvirus 4</i> )	EBV, <i>HHV 4</i>	(Epstein et al., 1965)
	Kaposi-Sarkoma assoziiertes Virus ( <i>Humanes Herpesvirus 8</i> )	HHV 8	(Chang et al., 1994)

Tabelle 1: Klassifizierung der humanpathogenen Herpesviren (Roizman et al., 1992).

Die  **$\alpha$ -Herpesviren**, d. h. die humanpathogenen Herpes simplex Viren (HSV), Typ 1 und 2 sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV) (Tabelle 1), zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum aus. Sie besitzen in vitro einen kurzen Replikationszyklus und sind in Zellkultur zytolytisch. In vivo weisen sie einen Neurotropismus auf.

Die  **$\beta$ -Herpesviren** (Tabelle 1), zu denen das HCMV gehört, sind absolut speziesspezifisch. Sie haben einen langen Vermehrungszyklus von bis zu 72 h oder mehr und sind ebenfalls zytolytisch. Durch das Cytomegalievirus infizierte Zellen zeigen u.a. als ein weiteres Merkmal eine deutliche Vergrößerung („Cytomegalie“). Die Vertreter dieser Unterfamilie sind primär lymphotrop, aber können auch andere Gewebe infizieren.

Die  **$\gamma$ -Herpesviren** (Tabelle 1), wie das Epstein-Barr-Virus (EBV), weisen ebenfalls ein enges Wirtsspektrum auf, die Dauer des Replikationszyklus ist allerdings bei den verschiedenen Virustypen unterschiedlich. Sie infizieren überwiegend B- und T-Lymphozyten. Darüber hinaus besitzen sie onkogenes Potential.

### 1.2.2 Virionstruktur

Das 200 nm große Virion weist die typische Herpesvirusarchitektur bestehend aus dem Viruskern, dem Nukleokapsid, dem Tegument und der viralen Hüllmembran auf (Abb.1.1). Der elektronendichte Viruskern mit einem Durchmesser von etwa 64 nm setzt sich aus dem 230 kbp großen, doppelsträngigen DNA-Genom und assoziierten Proteinen zusammen (Wright et al., 1964). Dieser wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von 100 nm besitzt. Kern und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid, das in eine amorphe Proteinmatrix, die fast ausschließlich aus Phosphoproteinen besteht und als Tegument bezeichnet wird, eingebettet ist. Das Phosphoprotein pp65 kann dabei bis zu 95% der Proteinmasse des Teguments ausmachen (Gibson & Irmieri, 1984). Die aus Wirtszellmembranen abgeleitete Virushülle besteht aus einer etwa 11 nm dicken Lipiddoppelschicht (Tooze et al., 1993), in die sowohl zelluläre als auch virale Glykoproteine eingelagert sind.

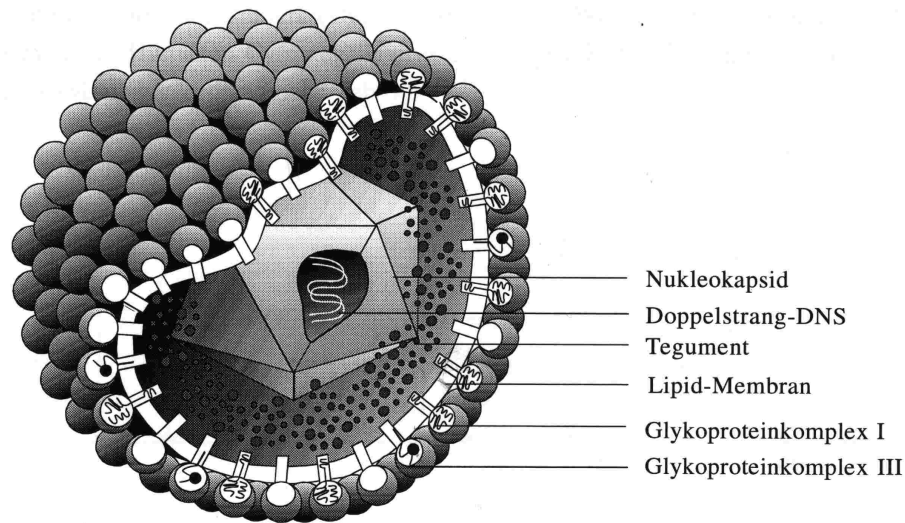
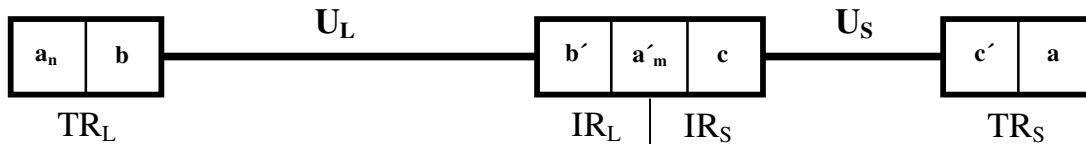


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV) (©M. Reschke)

### 1.2.3 Genomstruktur

Das doppelsträngige lineare DNA-Genom des HCMV ist mit 230 Kilobasenpaaren (kb) Länge das Genom mit der größten Kodierungskapazität aller humanpathogenen Herpesviren (Chee et al. 1990). Das Genom besteht aus einem langen (unique long,  $U_L$ ) und einem kurzen (unique short,  $U_S$ ) nicht-repetitiven Segment. Beide Segmente werden durch repetitive Sequenzen voneinander getrennt (internal repeat short,  $IR_S$  bzw. internal repeat long,  $IR_L$ ) und an den Enden flankiert (terminal repeat short  $TR_S$  bzw. terminal repeat long,  $TR_L$ ) (Abb. 1.2).

Im Verknüpfungsbereich zwischen  $IR_S$  und  $IR_L$  sowie an den Genomenden befinden sich die sogenannten a-Sequenzen, durch deren Verknüpfung vier isomere Genomformen entstehen können, die in äquimolarer Verteilung in allen HCMV-Populationen vorliegen (Stinski et al. 1983). Basierend auf der genannten Nomenklatur der Genomabschnitte werden die viralen Gene mit den Präfixen TR, IR,  $U_L$  oder  $U_S$  gekennzeichnet und die Leserahmen (ORF) fortlaufend nummeriert (Spaete et al., 1994): Virale Proteine, Phosphoproteine und Glykoproteine erhalten die Abkürzungen p, pp und gp, gefolgt vom ORF des codierenden Gens. Der vollständig sequenzierte Laborstamm „AD169“ besitzt 208 ORFs, von denen 54 für potentielle Glykoproteine kodieren (Chee et al., 1990).



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der Genomorganisation des HCMV

Das Genom des HCMV besteht aus zwei nicht-repetitiven Segmenten, dem UL („unique long“)- und dem US („unique short“)-Segment, die an den Enden von repetitiven Sequenzen, den „terminal repeats“ (TR) und den „internal repeats“ (IR) flankiert werden. Die Bezeichnungen  $a_n$ ,  $a'_m$  und  $a$  ( $b$  und  $b'$ ;  $c$  und  $c'$ ) stellen identische Basenabfolgen dar, die invertiert zueinander vorliegen.

### 1.2.4 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese

Der initiale Kontakt des HCMV mit der Wirtszelle erfolgt zuerst durch eine unspezifische Bindung des Virus an Heparansulfat-Proteoglykane der Wirtszelloberfläche (Compton et al., 1993). Bei diesem Vorgang spielen das virale Glycoprotein B (gB) (Navarro et al., 1993) und Glykoprotein H (gH) (Keay et al., 1989), sowie wirtseigenes  $\hat{Q}$ -Mikrotubulin eine wichtige Rolle. Im Anschluss an die *Adsorption*, bei der gB an einen bisher noch nicht identifizierten zellulären Rezeptor bindet, erfolgt die *Penetration* durch pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zielzelle (Compton et al., 1992), wobei die nun nicht mehr umhüllten Nukleokapside in das Zytoplasma gelangen.

Die eingeschleusten Kapside werden vermutlich analog zu Herpes Simplex-Virus 1 (HSV1) durch einen Dynein-vermittelten Transport an den Mikrotubuli entlang zum Zellkern transportiert (Sodeik et al., 1997). Nach Bindung der Kapside an die Kernpore wird die Virus-DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala et al., 2000) und dort zirkularisiert. Die Transkription und Expression der viralen Gene verläuft kaskadenartig und lässt sich auf molekularer Ebene in drei aufeinander folgende Phasen unterteilen (Wathen & Stinski, 1982).

#### 1. *Immediate-early (IE) Phase* (0,5-3 h nach Infektion)

In dieser *sehr frühen Phase* erfolgt die durch zelluläre Faktoren gesteuerte Transkription und Synthese regulatorischer Proteine, die zur Aktivierung der frühen Gene benötigt werden (Spaete & Mocarski, 1985; Geballe et al., 1986).

#### 2. *Early (E) Phase* (3-36 h nach Infektion)

In der *frühen Phase* kommt es zur Synthese von Produkten, die für die DNA-Replikation benötigt werden. Es wird unter anderem die virale DNA-Polymerase

induziert. Darüber hinaus wird die Synthese enzymatisch und regulatorisch notwendiger Proteine eingeleitet.

### 3. *Late (L) Phase* (36-72 h nach Infektion)

Die *späte Phase* beginnt mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation und dient vorwiegend der Expression von Strukturkomponenten.

Die Morphogenese der Tochtervirionen beginnt im Zellkern mit dem Aufbau der Kapsidstrukturen, in die anschließend virale DNA eingelagert wird. Man unterscheidet aufgrund elektronenmikroskopischer Kriterien drei verschiedene Kapsidformen, die A-, B- und C-Kapside, wobei B-Kapside als Vorläufer der A- und C-Kapside bezeichnet werden. Während DNA-freie A-Kapside durch Fehler bei der Verpackung der DNA entstehen, führt die korrekte Verpackung von Genomeinheiten zur Bildung reifer C-Kapside. Zur Verpackung wird die konkatemere virale DNA, die nach dem „*rolling circle*“ Mechanismus erzeugt wird (McVoy, Adler, 1994), vermutlich unter Beteiligung des Proteins p130 (pUL56), an den  $\alpha$ -Sequenzen auf Genomgröße zurechtgeschnitten und in die Kapside eingeschleust (Bogner, 2002).

Durch die sogenannte Transportknospung verlassen die Kapside den Kern und gelangen zunächst in die perinukleäre Zisterne, wobei sie eine temporäre, von der inneren Kernmembran abgeleitete Lipidhülle erhalten (Radsak et al., 1989). Diese fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran wobei die Nukleokapside ohne Umhüllung ins Cytoplasma freigesetzt werden. Die endgültige Umhüllung findet an Membranen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) statt (Tooze et al., 1993). Diese zweite Knospung, die sogenannte Reifungsknospung, führt zu Kapsiden mit doppelter Lipidhülle. Die äußere dieser Hüllen fusioniert im letzten Schritt, der Exocytose, mit der Plasmamembran der Wirtszelle, so dass reife, einfach umhüllte Virionen aus der Zelle freigesetzt werden.

### **1.3 Unterschiede zwischen attenuierten und wildtypischen(wt)-HCMV-Laborstämmen bzw. klinischen Isolaten**

Für experimentelle Untersuchungen werden meist Laborstämme verwendet. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe umfasst Stämme wie z.B. AD169 und Towne, die in zahlreichen Passagen an humane Fibroblasten adaptiert wurden und für den Menschen nicht pathogen sind. Diesen Stämmen gegenüber stehen Laborstämme wie z.B. Toledo, die nach vergleichsweise wenigen Zellkulturpassagen noch weitgehend wildtypische Eigenschaften aufweisen.

#### **1.3.1 Virulenz und Zelltropismus**

Für die an Fibroblastenkulturen adaptierten HCMV-Stämme AD169 (Elek und Stern, 1974) und Towne (Plotkin et al., 1976, Plotkin et al., 1984) wurde in klinischen Studien gezeigt, dass sie im Patienten eine Serokonversion verursachen, ohne dass apparente Krankheitserscheinungen festgestellt werden konnten. Der wildtypische Stamm Toledo hingegen verursachte bei Erwachsenen einen klinisch apparenten Krankheitsverlauf (Quinnan et al., 1984).

*In vitro* zeigen die Laborstämme AD169, Towne und der ebenfalls an Fibroblasten adaptierte Stamm Davis eine eingeschränkte Fähigkeit, Endothelzellen zu infizieren. Der Stamm Toledo und klinische Isolate zeichnen sich dagegen durch einen Endothelzelltropismus aus. Dieser geht aber, wie gezeigt wurde, durch das Passagieren in Fibroblasten verloren. Beim Passagieren in Endothelzellen bleibt er allerdings erhalten (Mac Cormac, Grundy, 1999; Tabelle 2).

Mit zunehmender Passagezahl auf Fibroblasten scheint es also nicht nur zu einer Abnahme der Virulenz, sondern auch zu einer Veränderung im Zelltypotropismus zu kommen.



	wt-HCMV z.B. Toledo	attenuierte Laborstämme z.B. AD169
<b>19 ORF's</b> in der Region UL133-UL151	+	-
Infektion von Fibroblasten	+	+
Infektion von Endothelzellen	+	-
humanpathogen	+	-

**Tabelle 2: Unterschiede zwischen wildtypischem (wt-) HCMV und attenuierten Laborstämmen**

### 1.3.2 Molekulargenetische Unterschiede

Von der Arbeitsgruppe Mokarski (Cha et al., 1996) konnte gezeigt werden, dass zwischen attenuierten Laborstämmen wie „Towne“ und „AD169“ und wildtypischen Stämmen wie „Toledo“ molekulargenetische Unterschiede bestehen. Bei dem wildtypischen Laborstamm „Toledo“ und klinischen Patientenisolaten wurde ein 13 -15 kb großes, zusätzliches DNA-Fragment nachgewiesen, welches in Laborstämmen wie „Towne“ und „AD169“ fehlt. Dieses Fragment liegt im UL/b'-Bereich des wildtypischen Genoms und enthält 19 offene Leseraster (ORF), die entsprechend der gültigen Nomenklatur als UL133-151 bezeichnet wurden (Tabelle 2). Offensichtlich geht diese genetische Information im Verlauf der Adaptierung an die Zellkultur verloren. Für die Vermehrung in humanen Fibroblasten kann dieser Genomabschnitt deshalb nicht essentiell (Cha et al., 1996) sein, da die Laborstämme „Towne“ und „AD169“ in diesen Zellen replizieren können. Allerdings ist dieser Bereich für die Vermehrung in Endothelzellen (Mac Cormac und Grundy, 1999) von Bedeutung, da in diesen eine Vermehrung der adaptierten Laborstämme nicht möglich ist.

Impfstudien haben gezeigt, dass Laborstämme wie „Towne“ und „AD169“ auch in Immunsupprimierten nicht pathogen sind, aber sowohl in immunkompetenten als auch in immunkompromittierten Patienten eine Serokonversion verursachen (Quinnan et al., 1984). Es ist nicht auszuschließen, dass die zusätzliche genetische Information in wildtypischem HCMV eine Bedeutung für die virale Pathogenität hat. Ein direkter Beweis für diese Annahme liegt jedoch derzeit noch nicht vor.

Bisher wurden nur zwei dieser 19 offenen Leseraster, UL 142 und 144, näher untersucht und charakterisiert. UL144 umfaßt 531 bp und wurde als Strukturhomolog

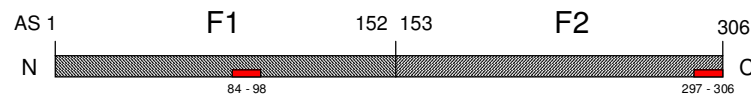
des HSV-„entry mediators“ (HveA) identifiziert, bei dem es sich um einen Tumornekrosefaktorrezeptor (Lurain et al., 1999) handelt. Durch Untersuchungen niedrig passagierter Isolate konnte auf Nukleinsäureebene ein Polymorphismus des UL144 festgestellt werden, aufgrund dessen Isolate in drei phylogenetische Gruppen eingeteilt werden können (Lurain et al., 1999).

Aus der kodierenden Sequenz von 921 bp des ORF UL142 lässt sich für den Stamm Toledo ein aus 306 AS bestehendes potenzielles Glykoprotein ableiten. Aus der deduzierten Aminosäuresequenz lassen sich 20 potenzielle N-Glykosylierungsstellen und 5 Myristilierungsstellen voraussagen (Cha et al., 1996).

Auch für ORF UL142 konnte nach Sequenzierung der Amplifikate von Patientenisolaten ein Polymorphismus nachgewiesen werden (Diss. M. Bergmann, 2003). Eine Zuordnung genetischer Merkmale zu bestimmten Krankheitsbildern war allerdings nicht möglich.

## 2. Problemstellung

Im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung des ORF UL142 des HCMV sollten in dieser Arbeit strukturelle Eigenschaften des potentiellen Genprodukts (pUL142) untersucht und vor allem geprüft werden, ob im infizierten menschlichen Organismus eine spezifische Immunantwort gegen pUL142 ausgelöst wird. Es sollte zunächst der Glykosylierungsstatus geklärt werden, um einen Hinweis auf die mögliche zelluläre Kompartimentierung des pUL142 zu erhalten. Für die geplanten serologischen Untersuchungen sollte sodann ein Immunoblotverfahren etabliert werden. Zu diesem Zweck sollten Fragmente des pUL142 prokaryotisch exprimiert sowie ein Immuns serum im Kaninchen gegen definierte potentiell antigene Epitope generiert werden (Abb. 2.1). Unter Verwendung der rekombinanten Proteine und des Kaninchens erums als positive Kontrolle sollten schließlich geeignete Patientenseren im Immunoblot auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen pUL142 getestet werden.



**Abb. 2.1 Darstellung des potentiellen pUL142**

Amino- und Carboxy-Terminus des Proteins sind durch die Buchstaben „N“ und „C“ dargestellt. Die beiden zu exprimierenden Proteinabschnitte sind mit „F1“ und „F2“ gekennzeichnet. Die Peptidsequenzen für die Herstellung des Immuns erums im Kaninchens erum sind rot unterlegt. Die Zahlen kennzeichnen die entsprechenden Positionen der Aminosäuresequenz.

### 3. Material

#### 3.1 Bezugsquellen

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen von den Firmen:

BioRad	München
Life Technologies	Eggenstein
Merck	Darmstadt
Riedel-de-Haen	Seelze
Roche	Mannheim
Roth	Karlsruhe
SigmaDeisenhofen	
Serva	Heidelberg

#### 3.2 Chemikalien

Aceton	Riedel de Häen, Seelze
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
2-Amino-2-(hydromethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	LKB, Bromma, Schweden
ATP	Roche, Mannheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco BRL, Eggenstein
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	J. T. Baker, Holland
4-Chloro-1-naphtol	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck, Darmstadt
DNA-molecular weight marker	Roche, Mannheim; Life Technologies, Eggenstein
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Häen, Seelze
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Riedel de Häen, Seelze
Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel de Häen, Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Gibco BRL, Eggenstein
Rainbow <sup>TM</sup> protein molecular weight marker 756	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Roche, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt

### 3.3 Antibiotika

Ampicillin (Amblosin <sup>®</sup> )	Bayer, Leverkusen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

### 3.4 Kulturmediengrundstoffe

Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Dulbecco's Modified Eagles Medium (1x)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco BRL, Eggenstein

### 3.5 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB), Schwalbach und der Firma Roche, Mannheim bezogen und entsprechend den Vorgaben der Hersteller verwendet.

### 3.6 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
AmpliTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein

### 3.7 Antikörper

#### 3.7.1 Gekoppelte Sekundärantikörper

Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus IgG vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
Alexa Fluor <sup>™</sup> 488 Anti-Maus-IgG von der Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Anti-Maus-IgG von der Ziege, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
--	------------------

Anti-Maus-IgG von der Ziege, Texas Red-gekoppelt	Dianova, Hamburg
---	------------------

Anti-Human-IgG von der Ziege, Rhodamin-gekoppelt	Dianova, Hamburg
---	------------------

### 3.7.2 Nicht-gekoppelte Sekundärantikörper

Anti-His-Tag-IgG Von der Maus	Qiagen, Hilden
-------------------------------	----------------

Anti-HCMV-gB <sup>c</sup> (mab 27-156) von der Maus	W. Britt, University of Alabama, Birmingham, USA
--	---

Anti-HCMV-gB <sup>c</sup> (mab 58-15-18) von der Maus	W. Britt, University of Alabama, Birmingham, USA
--	---

Anti-HCMV-IE-IgG von der Maus	DuPont, Dreieich
-------------------------------	------------------

### 3.7.3 Polyklonale Antikörper

Polyklonale, polyspezifische humane Anti-HCMV-Seren	Patientenseren, Inst. für Virologie, Marburg
--	---

Polyklonales, polyspezifisches Kaninchen Anti-HCMV-UL142-Serum	Firma Eurogentec Brüssel, Belgien
---	--------------------------------------

### 3.8 Sonstige Materialien

ABI PRISM Dye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
BioMax-Röntgenfilme	Kodak, USA
Deckgläschen (12 mm Durchmesser)	MAGV, Rabenau-Londorf
Easy-DNA <sup>TM</sup> Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
Eppendorf-Pipetten, -Spitzen, -Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Gel-Blotting-Papier	Schleicher&Schuell, Dassel
Lipofectin <sup>®</sup> -Reagent	Life Technologies, Eggenstein
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schuell, Dassel
Objektträger	MAGV, Rabenau-Londorf
Parafilm	American Can Company, Greenwich, USA
QIAgen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße, 200 µl	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Spritzen und Kanülen	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)	Beckman, München
Zellkulturflaschen, Petrischalen, Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Kunststoffröhrchen	

### 3.9 Geräte

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen



GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Labovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia, Freiburg
Photospektrometer DU40	Beckman, Glennrothes
Spot Kamera, Version 2.1.2	Diagnostic Instruments, Michigan, USA
Ultraschallgerät	Branson, Dambury
Ultrazentrifuge L7-55/L8-55M	Beckman, Frankfurt
UV-Lampe 2238 UV/CORD SII	LKB, Bromma, Schweden
Zentrifuge J2-21	Beckman, Frankfurt
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

### 3.10 Medien

#### *Luria-Bertani Broth (LB-Medium)*

Bacto-Hefe-Extrakt	5,0 g/l
Bacto-Trypton	10,0 g/l
Natriumchlorid	10,0 g/l
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,5 g/l
<i>aqua bidest.</i>	

#### *LB-Agar*

Bacto-Hefe-Extrakt	5,0 g/l
Bacto-Trypton	10,0 g/l
Natriumchlorid	10,0 g/l
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,5 g/l
Bacto-Agar	15,0 g/l
<i>aqua bidest.</i>	

*LB<sup>amp</sup>-Medium/LB<sup>amp</sup>-Agar*

LB-Medium/LB-Agar

Ampicillin	0,10 mg/l
------------	-----------

*LB<sup>kan</sup>-Medium/ LB<sup>kan</sup>-Agar*

LB-Medium/LB-Agar

Kanamycin	0,03 mg/l
-----------	-----------

*Kulturmedium für eukaryotische Zellen*

Dulbecco's Medium (1x) (DMEM)	500,0 ml
-------------------------------	----------

Fötales Kälberserum (FKS)	50,0 ml
---------------------------	---------

L-Glutamin 200 mM (100x)	5,0 ml
--------------------------	--------

Penicillin/Streptomycin	5,0 ml
-------------------------	--------

**3.11 Puffer***Blot-PBS*

Natriumchlorid	200,0 mM
----------------	----------

di-Natriumhydrogenphosphat	19,0 mM
----------------------------	---------

Kaliumdihydrogenphosphat	2,2 mM
--------------------------	--------

*aqua bidest.**Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS-Puffer)*

di-Natriumhydrogenphosphat	19,0 mM
----------------------------	---------

Kaliumhydrogenphosphat	2,2 mM
------------------------	--------

Natriumchlorid	0,2 mM
----------------	--------

*aqua bidest.*

*Probenpuffer pH 6,8*

Tris-HCL	200,00 mM
β-Mecaptoethanol	4,00 % (v/v)
SDS	4,00 % (w/v)
Glycerin	40,00 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
<i>aqua bidest.</i>	

*TAE- Puffer (50x)*

Tris	2000,00 mM
EDTA	50,00 mM
Eisessig	5,71 % (v/v)
<i>aqua bidest.</i>	

*TBE-Puffer (10x)*

Tris	900,0 mM
Borsäure	900,0 mM
EDTA	10,0 mM
<i>aqua bidest.</i>	

**3.12 Zellkulturen****3.12.1 Humane Vorhautfibroblasten**

Operativ gewonnene humane Vorhäute von Säuglingen wurden freundlicherweise von der Praxis Dr. A. von Keitz in Marburg zur Verfügung gestellt und deren Fibroblasten mit Standardmethoden in Kultur gebracht.

**3.13 Virusstämme**

HCMV AD 169	Gupta et al., 1977
HCMV Toledo	Dr. Sinzger, Tübingen

### 3.14 Bakterienstämme

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich *Escherichia coli* K12-Stämme verwendet.

#### 3.14.1 E. coli XL1-Blue

Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>*

*F<sup>-</sup> proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)*

(Bullock et al., 1987)

#### 3.14.2 E. coli M15

Genotyp: *Nal<sup>S</sup> Str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup>, lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup>*

(gemäß den Angaben des Herstellers Qiagen, Hilden)

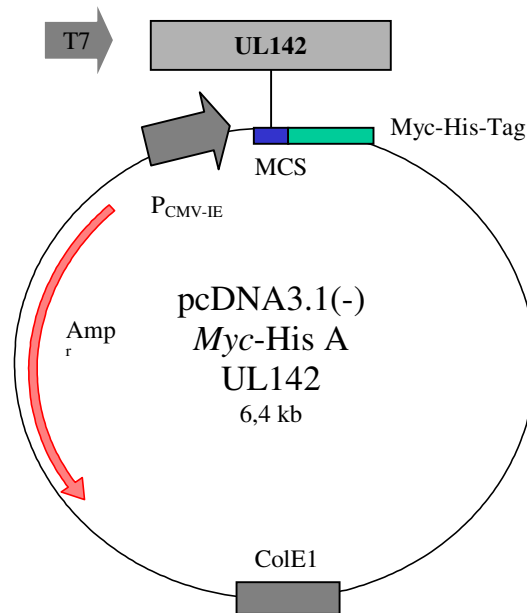
### 3.15 Plasmide

#### 3.15.1 pcDNA3.1(-)/Myc-His A

Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/Myc-His A wurde von der Firma Invitrogen, Heidelberg bezogen (Abb. 3.1). Durch die Gene für  $\beta$ -Laktamase (Ampicillinresistenzgen, Amp<sup>r</sup>) und Aminoglycosid-Phosphotransferase (Neomycinresistenzgen, Neo<sup>r</sup>) ist eine Selektion sowohl transformierter Bakterien wie auch transfizierter eukaryotischer Zellen möglich. In die Polylinkerregion inserierte Fremd-DNA steht unter der Kontrolle des HCMV „major immediate early“-Promotors (MIEP)/Enhancers, der die Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem Fremd-Protein und einem Myc-His-Fusionsepitop, ermöglicht.

Eine in vitro-Translation des Fusionsproteins kann aufgrund des T7-Promotors (T7) durchgeführt werden.

Neben dem ColE1 ori, der für die Replikation des Vektors in *E.coli* benötigt wird, kann sich der Vektor durch den SV40 ori in Zelllinien replizieren, die latent mit SV40 infiziert sind oder das SV40 LargeT-Antigen exprimieren (z.B. Cos7).

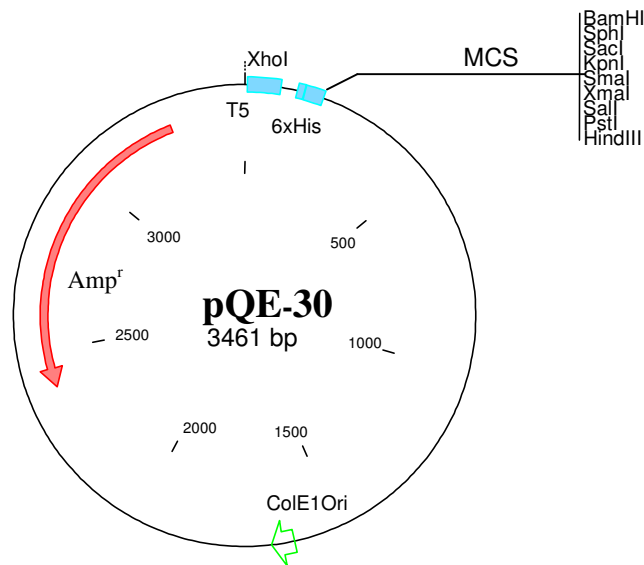


**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionvektors pcDNA3.1 (-)/Myc-His A**

Den Konstrukten pcDNA3.1(-)/Myc-His A-UL142 und pcDNA3.1(-)/Myc-His A-GL wurde in die Polylinkerregion das UL142 des HCMV inseriert, beziehungsweise das UL115 des HCMV, welche für das Glycoprotein L (GL) des HCMV codiert.

### 3.15.2 Der Expressionsvektor pQE-30

Der Expressionsvektor pQE-30 wurde von der Firma Qiagen, Hilden, bezogen (Abb. 3.2). Stromaufwärts der multiple cloning site (MCS), in die unter Einhaltung des Leserasters ein Fremdgen inseriert werden kann, enthält der Vektor einen 6xHis-Tag. Zur Induktion der Expression des inserierten Gens mittels IPTG ist diesem ein T5-Promoter/Lac-Operator-Element vorgeschaltet. Der Vektor enthält weiterhin einen ColE1 Ori zur Replikation sowie ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion in Bakterien.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Vektors pQE-30**

Dargestellt ist der Vektor pQE-30 mit MCS und Sequenz zur kodierung des N-terminalem 6xHisTag (6xHis). Er enthält ein T5Promoter/Lac-Operator-Element (T5), einen ColE1 Ori und ein  $\beta$ -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz-Gen, Amp<sup>r</sup>).

### 3.16 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL, Eggenstein, und Sigma Ark, Deisenhofen, bezogen. Die Nummerierung der Oligonukleotide, die an den Genabschnitt UL142 binden, orientiert sich an der publizierten Sequenz der HCMV „Toledo“-UL/b'-Region (Cha et al., 1996).

Die unterstrichenen Sequenzabschnitte stellen die Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen dar.

Die im folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Sequenzierreaktion eingesetzt.

<b><u>Bezeichnung/Sequenz</u></b>	<b><u>Position (bp)</u></b>
<b>UL142/F1 hin (BamHI)</b>	
5`CGGGATCCATGCGGATTGAATGG <sup>3`</sup>	6448-6462
<b>UL142/F1 rück (PstI)</b>	
5`CAACTGCAGGGATGTTAGTGTTAG <sup>3`</sup>	6891-6906
<b>UL142/F2 hin (BamHI)</b>	
5`CGGGATCCTCGGGATGGCAAGAC <sup>3`</sup>	6907-6922
<b>UL142/F2 rück (PstI)</b>	
5`CAACTGCAGTTACTGACCGCGCCATAC <sup>3`</sup>	7350-7368

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

##### 4.1.1.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Zur Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde der "QIAprep Spin Kit" der Firma Qiagen, Hilden, verwendet. Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse-Methode für den Aufschluß der Bakterien und macht sich die Eigenschaft von DNA zunutze, in Anwesenheit eines hohen Salzgehaltes an eine Silica-Matrix zu binden.

Von einer über Nacht (ÜN) auf dem Reagenzglas-Roller bei 37°C in LB-Medium<sup>amp</sup> gewachsenen Bakterien-Kultur wurden 1,5 ml bei Raumtemperatur (RT) 5 min bei 13000 rpm (Biofuge 13) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgte eine Resuspension der sedimentierten Zellen in 250 µl P1-Puffer. Durch die Zugabe von 250 µl P2-Puffer erfolgte das Auflösen der Zellmembranen und die Denaturierung der DNA. Mit 350 µl N3 Puffer wurde die Lyse gestoppt und die Plasmid-DNA renaturiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der plasmidhaltige Überstand auf die Silicagel-Matrix gegeben. Die Bindung der DNA an die Matrix sowie das Waschen der Säule mit 750 µl PE-Puffer erfolgte durch einminütige Zentrifugation der Flüssigkeiten bei 13000 rpm durch die Säule. Zur Entfernung des restlichen Waschpuffers wurde erneut 1 min zentrifugiert. Die DNA konnte in Folge mit 50 µl *aqua bidest.* eluiert werden.

##### 4.1.1.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)

Für die Präparation großer DNA-Mengen (bis zu 1 mg) wurde der "QIAGEN Filter Plasmid Maxi Kit" der Firma Qiagen verwendet.

Bakterien einer ÜN in 200 ml LB-Medium<sup>amp</sup> gezogenen Kultur wurden für 20 min bei 5000 rpm und 4° C sedimentiert (Rotina48R, Hettich, Tuttlingen). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Während fünfminütiger Inkubation mit Puffer P2 erfolgte die Lyse der Bakterien. Diese Reaktion



wurde durch Zugabe von 10 ml P3-Puffer gestoppt, das Lysat in eine "QIAFilter"-Spritze überführt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Die unlöslichen Komplexe wie chromosomale DNA und Proteine wurden durch Filtration abgetrennt. Das klare Lysat wurde über eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte "Qiagen 500"-Säule gegeben. Die an die Säule gebundene DNA wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen und mit 15 ml Puffer QF direkt in ein SW28-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (96%) gefällt und für 30 min bei 13000 rpm und 4°C sedimentiert (Ultrazentrifuge L7-55, Beckmann, Frankfurt). Das Sediment wurde mit 1,5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und die DNA nach Lufttrocknung je nach Größe des Sediments in 100-300 µl *aqua bidest.* aufgenommen. Nach photometrischer Bestimmung (siehe Kap. 4.1.3.) der Konzentration konnte die DNA-Lösung mit *aqua bidest.* auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt werden.

*LB-Medium<sup>amp</sup>* siehe 3.11.

*LB-Medium<sup>kan</sup>* siehe 3.11.

*Puffer P1 (pH 8,0)*

Tris/HCl	50,0 mM
EDTA	10,0 mM
RNase	400,0 µg/ml

*Puffer P2*

Natriumhydroxid	200,0 mM
SDS	1,0 % (w/v)

*Puffer P3 (pH 4,8)*

Kaliumacetat	255,0 mM
Puffer QBT (pH 7,0)	750,0 mM
Natriumchlorid	50,0 mM
MOPS	15,0 % (v/v)
Ethanol	

*Puffer QC (pH 7,0)*

Natriumchlorid	1000,0 mM
MOPS	50,0 mM
Ethanol	15,0 % (v/v)

*Puffer QF (pH 8,0)*

Natriumchlorid	1200,0 mM
MOPS	50,0 mM
Ethanol	15,0 % (v/v)

Die Zusammensetzung der Puffer PB und PE werden vom Hersteller (Qiagen, Hilden) nicht näher erläutert.

**4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen**

Mit Hilfe eines Quant II-Spektrophotometer (Pharmacia, Freiburg) erfolgte die Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung in einer Quarzküvette (1 cm Lichtweg) durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm. Um dem linearen Meßbereich von  $E=0,1-0,8$  zu entsprechen, wurde die DNA-Lösung mit *aqua bidest.* entsprechend verdünnt (10-100 fach). Bei der Konzentrationsberechnung gilt folgende Beziehung:

DNA (doppelsträngig):  $OD_{260\text{ nm}} = 1,0$  entspricht 50  $\mu\text{g}$  DNA/ml  
DNA (Oligonukleotide):  $OD_{260\text{ nm}} = 1,0$  entspricht 50  $\mu\text{g}$  DNA/ml  
(Sambrook et al., 1989).

**4.1.3 Restriktion von Plasmid-DNA mit Endonukleasen**

Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde für die Analyse sowie zur Präparation definierter DNA-Abschnitte mit Restriktionsendonukleasen behandelt.

*4.1.3.1 Analytische Restriktion von DNA*

Für die analytischen Restriktionen wurden 0,2 bis 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt. Diese wurde mit 10-fachen Inkubationspuffers sowie 1 bis 5 Einheiten des Enzyms

versetzt und durch Zugabe von *aqua bidest.* zu einem Gesamtvolumen von 10 µl ergänzt. Die Inkubation erfolgte bei der für die jeweilige Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur über einen Zeitraum von 120 min.

#### 4.1.3.2 Präparative Restriktion von DNA

Für die Gewinnung von definierten Plasmidabschnitten im größeren Maßstab wurden 1 bis 20 µg DNA eingesetzt. Die Volumina dieser Ansätze variierten zwischen 30 und 100 µl und enthielten 1 bis 15 Einheiten der Restriktionsendonuklease sowie die einfache Konzentration des entsprechenden 10-fachen Inkubationspuffers. Die Inkubationszeit betrug auch hier bei der erforderlichen Temperatur zwischen 40 und 120 min.

#### 4.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die Agarosegel-Elektrophorese diente zur analytischen Auftrennung und präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten.

Die DNA-Fragmente wurden dazu mit einem Fünftel 6-fachen DNA-Probenpuffers versetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Minigel-Kammer (Bio-Rad, Richmond, USA) mit 1-2 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer sowie Ethidumbromid in einer Konzentration von 0,15 µg/ml Gel zur Sichtbarmachung der DNA. Es wurde eine Spannung von 8 V/cm Gel angelegt. So konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda=302$  nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden. Zur Abschätzung der Größe der Fragmente wurden verschiedene DNA-Marker (Boehringer, Mannheim; Gibco BRL, Eggenstein) verwendet.

##### *Probenpuffer (6-fach)*

Glycerin	30,00 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)

*aqua bidest.*

*TAE-Puffer* siehe 3.12.

#### 4.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von präparativen Ansätzen (4.1.4) wurden die DNA-Fragmente von Interesse unter UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten.

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde der "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen, Hilden, verwendet.

Zu je 100 mg ausgeschnittener Agarose wurden 300  $\mu$ l Puffer QG gegeben und das Gemisch für 10 min bei 50°C inkubiert. Eine bereits vom Hersteller mit Silicagel beschickte Säule wurde mit dieser Suspension beladen und diese bei 13000 rpm in der Microfuge für 1 min durch die Silicamembran hindurch zentrifugiert. Die am Säulenmaterial gebundene DNA wurde mit 750  $\mu$ l PE-Puffer gewaschen, und mit 30  $\mu$ l *aqua bidest.* eluiert.

Zu der Zusammensetzung der Puffer PE und QG machte der Hersteller keine näheren Angaben.

#### 4.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation linearisierter Vektoren- und Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA - Ligase. Diese Ligase verknüpft 5'-Phosphatenden mit 3'-OH-Enden unter ATP-Verbrauch. Zur Verhinderung einer Religation der durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektoren wurden diese dephosphoryliert. Dazu wurden 40  $\mu$ l Vektor-DNA-Lösung mit 5  $\mu$ l 10-fach Dephosphorylierungspuffer und 5  $\mu$ l (= 1 Einheit) alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde dann in einem molaren Verhältnis von 1:10 zur Insert-DNA in die Ligrationsreaktion eingesetzt.

In einem Gesamtansatz von 20  $\mu$ l wurden ca. 10 ng Vektor-DNA, die ca. 10-fache Menge Insert-DNA, 1 mM ATP, 2  $\mu$ l 10-fach Ligationpuffer sowie 2 Einheiten T4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim) zugegeben. Die Ligation fand ÜN bei RT statt.

##### *Dephosphorylierungspuffer, pH 8,3*

Tris/HCl	100 mM
ZnCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

*Ligationspuffer, pH 7,8*

Tris/HCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
ATP	10 mM
BSA	250 µg/ml
DTT	100 mM

**4.1.7 Transformation von *E. coli***

Unter Transformation versteht man das Einbringen nackter Fremd-DNA in eine entsprechend vorbehandelte Bakterienzelle. Normalerweise ist die Aufnahme freier DNA durch Bakterien nicht sehr effizient. Deshalb wird diese Effizienz durch eine spezifische Vorbehandlung erhöht (Dagert, Ehrlich, 1979). Diese entsprechend vorbehandelten Bakterienzellen werden auch als „kompetente“ Zellen bezeichnet.

*4.1.7.1 Herstellung kompetenter Zellen*

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation mittels Hitzeschock wurden 5 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin mit dem *E.coli*-Stamm *XL-1-Blue* oder *M15* angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 12 h wurde eine 1:100 Verdünnung der Kultur in 100 ml des Kulturmediums bis zu einer Dichte von etwa  $4 \cdot 10^7$  Zellen/ml bei 37°C auf dem Schüttler herangezogen. Die Bakterienzellen wurden nach 15-minütiger Inkubation auf Eis bei 2600 rpm für 15 min bei 4°C sedimentiert (Rotina 48R) und in 33 ml RF1-Puffer resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2600 rpm und 4°C für 15 min. Das Sediment wurde in 8 ml RF2-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung dieser Zellen, die nicht direkt für die Transformation verwendet wurden, erfolgte bei -80°C in Aliquots zu 200 µl.

*LB-Medium* siehe 3.10.

*RF1-Puffer pH5,8*

RbCl	100,0 mM
MnCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	50,0 mM
KAc	30,0 mM
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	10,0 mM
Glycerol	15,0 %(w/v)

*aqua bidest.*

*RF2-Puffer pH6,8*

MOPS	10,0 mM
RbCl	10,0 mM
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	75,0 mM
Glycerol	15,0 %(w/v)

*aqua bidest.*

Die Pufferlösungen wurden sterilfiltriert.

*4.1.7.2 Transformation*

Für die Transformation wurden 200 µl der kompetenten Bakterien mit 1 µl reiner Plasmid-DNA oder 10 µl des Ligationsansatzes vermischt. Eine Inkubation für 40 min auf Eis ermöglichte die Anlagerung der DNA an die Bakterienzellwand. Durch den anschliessenden Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden erfolgte die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium erfolgte eine Inkubation bei 37°C zur Ausbildung der gewünschten Antibiotika-Resistenz (30 min für Ampicillin; 90 min für Kanamycin). Der Ansatz wurde auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

<i>LB-Medium</i>	siehe 3.11
<i>LB-Agar<sup>amp/kan</sup></i>	
LB-Agar	siehe 3.12
Ampicillin; Kanamycin	0,1 mg/l; 0,03 mg/l

#### 4.1.8 Herstellung von Glycerinzellen

Bakterien wurden zur längeren Aufbewahrung im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (86%) vermischt und bei -20°C gelagert.

#### 4.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 4.1.9.1 Amplifikation von DNA-Abschnitten durch die PCR

Eine exponentielle Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes wurde durch die Polymerasekettenreaktion mit Hilfe zweier antiparallel hybridisierender Oligonukleotide erreicht (Mullis und Faloona, 1987). Verwendet wurde eine thermostabile DNA-Polymerase, so dass eine zyklische Abfolge von Denaturierung und Hybridisierung der Oligonukleotide mit der DNA-Matrize und eine Kettenverlängerung erfolgen konnte.

Diese Methode wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus viraler DNA und von DNA-Fragmenten aus Plasmiden eingesetzt.

An den 5'-Enden der eingesetzten Oligonukleotide befanden sich Sequenzen, die nicht komplementär zur Matrize waren und die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen trugen, welche bei den darauf folgenden Klonierungen zum Einsatz kommen sollten.

##### 4.1.9.2 Reaktionsansatz und -zyklus der PCR

Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Thermocycler „GeneAmp PCR System 2400“ (Perkin Elmer, Norwalk, USA) in 200 µl-Reaktionsgefäßen (Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt.

Zur vollständigen Denaturierung der Matrize wurde der Reaktionsansatz zu Beginn des Amplifikationszyklus je nach Größe der DNA 30 Sekunden bis 4 min bei 96°C

inkubiert. Anschließend begann der folgende Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation, der 35 mal wiederholt wurde:

*Reaktionszyklus:*

- |                    |                          |          |
|--------------------|--------------------------|----------|
| 1. Denaturierung:  | 96°C                     | für 60 s |
| 2. Hybridisierung: | 55-60°C                  | für 60 s |
|                    | (je nach Oligonukleotid) |          |
| 3. Polymerisation: | 72°C                     | für 60 s |

Eine abschließende Inkubation von 7 min bei 72°C gewährleistete eine Vervollständigung der Amplifikate, bevor die Reaktion beendet und das Reaktionsgefäß auf 4°C abgekühlt wurde.

*Reaktionsansatz*

<i>Komponenten</i>	<i>Endkonzentration</i>
10-fach PCR-Puffer	1-fach
dATP	400 µM
dCTP	400 µM
dGTP	400 µM
dTTP	400 µM
Oligonukleotid 1	0,1-1 µM
Oligonukleotid 2	0,1-1 µM
DNA-Matrize	0,2-1 ng/µl
AmpliTa <sup>®</sup> q DNA-Polymerase	0,0250 U/µl
ad 100 µl <i>aqua bidest.</i>	

Ein Zehntel des Reaktionsansatzes wurde für die analytische Agarosegelelektrophorese verwendet (s. 4.1.4). Der Rest wurde zur Weiterverwendung mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ entsprechend den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Hierzu wurde der Ansatz mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB vermischt und durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge pico) an die Silica-Membran der mitgelieferten Säule gebunden. Diese wurde zweimal mit 750 µl Puffer PE gewaschen und die DNA mit 30 bis 50 µl *aqua bidest.* eluiert.



Zur Zusammensetzung der Puffer PB und PE werden vom Hersteller keine näheren Angaben gemacht.

#### 4.1.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde zur Kontrolle von Klonierungen mittels der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der "ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer) verwendet und die Auswertung erfolgte mittels eines ABI PRISM-337-Sequenzers (Perkin Elmer).

##### 4.1.10.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion basiert auf Verlängerung eines zum Matrizen-Strang komplementären Oligonukleotids und Kettenabbruch mit einem Gemisch aus fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTP) und unmarkierten Desoxynukleotiden (dNTP). Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide sind dabei mit je einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, so dass die zu sequenzierende Probe in einer „Spur“ gelelektrophoretisch aufgetrennt werden kann. Für die Sequenzierreaktion wurden DNA-Mengen von 1 µg eingesetzt. Die Matrizen-DNA wurde zu 20 pmol des Oligonukleotids in wässriger Lösung und 4 µl des „Terminator-Mix“ gegeben. Im „Terminator-Mix“ befinden sich die Nukleotide dITP, dATP, dCTP, dTTP, deren fluoreszenzmarkierte Didesoxyanaloga und der Reaktionspuffer. Der Ansatz wurde mit *aqua bidest.* auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt. Die Sequenzierreaktion erfolgte wie die PCR in einem GeneAmp PCR System 2400-Thermocycler (Perkin Elmer) in einem 200 µl-Reaktionsgefäß.

##### Reaktionszyklus:

1. Denaturierung:	96°C	30 s
2. Hybridisierung:	50°C	30 s
3. Polymerisation:	60°C	4 min

Der Reaktionszyklus wurde 25-mal durchgeführt.

#### 4.1.10.2 Aufreinigung der Sequenzieransätze

Nach Abschluß der Reaktion wurde die DNA durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und zweieinhalb Volumen Ethanol (96 %) präzipitiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13 000 rpm (Biofuge pico) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Sediment mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und die DNA anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Präzipitat wurde in 3 µl Sequenzierproben-Puffer resuspendiert und vor dem Auftragen auf das Sequenziergel für 5 min bei 95°C denaturiert.

#### Sequenzierproben-Puffer

Formamid	80 % (w/v)
Dextran-Blau	1 % (w/v)
EDTA	5 mM

#### 4.1.11. Sequenziergel und Elektrophorese

Nach sorgfältiger Reinigung der Glasplatten des Elektrophoresesystems (ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, USA) mit Alconox und 10 %iger (v/v) wässriger Isopropanol-Lösung wurden diese zusammen mit 0,2 mm dicken Abstandhaltern in den Rahmen eingespannt. Die entionisierte Harnstoff-Acrylamidlösung wurde mit TBE-Puffer (Endkonzentration 1x) ausgiebig vermischt und vor Einleiten der Polymerisation entgast. Die Polymerisation dieser Lösung wurde durch Zugabe von 350 µl 10 %iger, wässriger APS-Lösung sowie 15 µl TEMED gestartet, die Gellösung zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in den Sequenzierautomaten eingebaut und ein Vorlauf bei einer Spannung von 1680 V für eine Stunde in 1xTBE-Puffer durchgeführt. Im Anschluß wurden je 2 µl der Sequenzierproben aufgetragen. Nun folgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 1680 V, einer Stromstärke von 50 mA und einer Temperatur von 51°C für 10 h.

Mittels eines Argonlasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe der Didesoxynukleotide zur Emission anregt, erfolgte die Analyse der Rohdaten. Eine Kamera diente zur Aufnahme der Lichtimpulse, die zur Auswertung digitalisiert wurden. Mit der Software „ABI PRISM<sup>TM</sup>377 Data Collection“ konnten die Sequenzierdaten aufbereitet werden.

*TBE-Puffer (10-fach)*

Tris	900,0 mM
Borsäure	900,0 mM
EDTA	10,0 mM

*Polyacrylamid-Harnstoff-Lösung*

Harnstoff	21,0 g
Acrylamid-Lösung (30%)	8,4 ml
TBE-Puffer (10-fach)	6,0 ml
ad 20 ml <i>aqua bidest.</i>	

## 4.2 Proteinchemische Methoden

### 4.2.1 *In vitro* Transkription/Translation

Eine *in vitro* Transkriptions/Translationsreaktion wurde anstelle einer eukaryotischen Expression von Fremd-Genprodukten durchgeführt. Sie diente der Kontrolle der korrekten Transkription und Translation von Genen, die in einen Vektor kloniert wurden, der einen T7 Promotor enthält.

Es wurde das TNT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transkription/Translation System verwendet (Promega, Madison, USA), das die Transkription und Translation von Genen ermöglicht, die hinter den T7-Promotor kloniert wurden.

Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl 35S Methionin und 20 µl des im Kit enthaltenen TNT<sup>®</sup> T7 Quick Master Mixes, der die RNA-Polymerase, Nukleotide, Salze, einen Ribonuklease-Inhibitor und eine Retikulozyten-Lysat-Lösung enthielt, wurden einige der Ansätze mit Hunde-Pankreas-Mikrosomen (2 µl) zur Glycosylierung versetzt. Alle Ansätze wurden mit *aqua bidest.* auf ein Endvolumen von 25 µl eingestellt und 90 min bei 30 °C inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 4.2.3) aufgetrennt und in der Autoradiographie analysiert (s. 4.2.5).

#### 4.2.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte mit dem prokaryotischen Expressionssystem pQE30 der Firma Qiagen (s. 3.15.2) durch *E.coli* M15-Zellen (s. 3.14.2)

##### 4.2.2.1 Expression von rekombinanten Proteinen mittels pQE-System

Zur Überprüfung der Expressionsrate von transformierten Bakterienzellen wurden 10 ml LB-Medium<sup>Amp+Kan</sup> mit 200 µl einer entsprechend transformierten ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD<sub>595</sub>=0,7-0,9 inkubiert. Die Induktion zur Synthese des Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von 1,5 mM IPTG. Unmittelbar vor Induktion sowie nach dieser wurden in stündlichen Abständen von 1-4 h Proben von 1 ml entnommen. Diese wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 3000 rpm (Biofuge pico) 3 min pellettiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert, um später eine Expressionskontrolle per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot durchzuführen.

Zur Gewinnung größerer Mengen des Fusionsproteins wurden 500 ml LB-Medium<sup>Amp+Kan</sup> mit 10 ml einer transformierten, über Nacht gewachsenen *E. coli* M15-Kultur angeimpft und wiederum auf dem Schüttler bis zu einer OD<sub>595</sub>=0,7-0,9 inkubiert. Es wurde nun mit IPTG in einer Endkonzentration von 1,5 mM induziert und die Kultur für weitere 4 h auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor Induktion und nach 4 h post Induktion wurden 1 ml-Proben zur Induktionskontrolle abgenommen (s.o.). Die verbliebene Kultur wurde für 20 min bei 4000 rpm und 4°C (Rotina 48R) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zur Vorbeugung vor proteolytischem Abbau der zu untersuchenden Proteine in 50 ml PBS, das 0,3 mM PMSF und 100 Einheiten Trasylol/ml enthielt, resuspendiert und erneut sedimentiert. Falls das Pellet nicht sofort weiterverarbeitet wurde, erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

*LB-Medium*<sup>Amp+Kan</sup> s. 3.11

*Probenpuffer* s. 3.12

#### 4.2.2.2 Aufreinigung von prokaryotisch exprimierten Fusionsproteinen

Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe einer Ni-NTA-Agarose-Säule der Firma Qiagen, Hilden. Das Prinzip dieses Systems beruht auf einer spezifischen Bindung des 6xHistidin-Tag des Fusionsproteins zum Ni-NTA-Trägermaterial unter denaturierenden Bedingungen bei einem pH-Wert von 8,0. Der NTA-Ligand besitzt sechs Bindungsstellen, von denen vier mit Metallionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ) interagieren, während die verbliebenen zwei Bindungsstellen für die Bindung von Fusionsproteinen, die einen sechsfachen Histidin-Tag tragen, zur Verfügung stehen. Die wirtseigenen, unspezifisch am Trägermaterial gebundenen Proteine können unter stringenten Bedingungen durch Waschen entfernt werden ohne die Bindung zwischen Trägermaterial und Fusionsprotein zu beeinträchtigen. Die Bindungskapazität des Trägermaterials beträgt 5-10 mg Fusionsprotein pro ml Ni-NTA-Agarose.

Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet (s. 4.2.2.1) 15 min auf Eis aufgetaut, in 2,5 bis 3 ml PufferA pro g Feuchtgewicht resuspendiert und anschließend für 1 h bei RT unter kräftigem Rühren lysiert. Das Lysat wurde anschließend für 15 min bei 6000 rpm und 4°C (Zentrifuge J2-21, Beckmann) zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde auf eine mit in Puffer A äquilibrierter Ni-NTA-Agarose beladene Polypropylensäule gegeben. Er wurde langsam (Flussrate 10-15 ml/h) durch diese hindurch laufen gelassen, um dem Fusionsprotein die Möglichkeit zu geben, an das Trägermaterial zu binden. Es folgten pH-Gradient-gebundene Waschschrte mit den Puffern A-C. Hier wurde je Puffer das 10-20fache Säulenvolumen bei einer Flussrate von 10-20 ml/h eingesetzt und die wirtseigenen, unspezifisch gebunden Proteine aus der Säule entfernt. Das gebundene Fusionsprotein wurde durch 10 ml Elutionspuffer (Puffer C + 250mM Imidazol) vom Säulenmaterial gelöst und in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt.

Die Kontrollen, das heißt die einzelnen Waschfraktionen, wurden zum Entfernen des Guanidin-Hydrochlorid mit Trichlor-Essigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden die Pellets in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen, mit 1 VT 10 % TCA 20 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 13000 rpm und 4°C sedimentiert (Biofuge pico). Das Pellet wurde mit 1 VT 100 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Probenpuffer aufgenommen. Je 15 µl der gesammelten Fraktionen wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt. Der Nachweis der Protein-Aufreinigung erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 4.2.3) und anschließender Coomassie-Färbung (s. 4.2.4) bzw. Immunoblot (s. 4.4.6).

*Probenpuffer* s. 3.12

*Puffer A*

Guanidin-HCl	6 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
Tris/HCl	10 mM

*aqua bidest.*

*Puffer B pH 8,0*

Harnstoff	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
Tris/HCl	10 mM

*aqua bidest.*

*Puffer C pH 6,3* gleiche Zusammensetzung  
wie Puffer B

Der pH-Wert der Puffer wurde unmittelbar vor Verwendung mit NaOH beziehungsweise HCl eingestellt.

#### 4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das zum Ausgleich der Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen eingesetzt wird. SDS wird von den meisten Polypeptiden in einem konstanten Gewichtsverhältnis gebunden, so dass jedes gebundene SDS-Molekül 2 negative Ladungen zur Gesamtladung des Proteins beiträgt. In der Gelelektrophorese wandern die komplexierten Polypeptide annäherungsweise entsprechend ihrer Molekularmasse in Richtung Anode. Auch Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine haben Einfluß auf das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und Hitzedenaturierung können diese Unterschiede reduziert werden.

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse erfolgte in dieser Arbeit mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Gallwitz et al., 1978).

Ein 11 bis 15 %iges Polyacrylamidgel (Trenngel) wurde bei diesem System mit einem 3,75 %igem Polyacrylamidgel (Sammelgel) überschichtet. Das Sammelgel wurde mit den in Probenpuffer aufgekochten Proteinpräparationen beladen. Zum Einlaufen der Probenfront wurde die Gelelektrophorese bei einer Stromstärke von 2 mA/cm gestartet, die nach Eintritt der Bromphenolblau-Front in das Trenngel zur Auftrennung der Proteine auf 3,5 mA/cm erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die Bromphenolfront die untere Gelkante erreicht hatte.

Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurden Molekulargewichtsmarker (Rainbow™ protein molecular weight marker 756, Amersham, Braunschweig) eingesetzt.

*Sammelgel (3,75 %)*

Acrylamid	3,75 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	10,00 % (w/v)
Tris/HCl pH 6,8	125,00 mM
SDS	0,10 % (w/v)
APS	0,04 % (w/v)
TEMED	0,10 % (v/v)

*aqua bidest.*

*Trenngel (15 %)*

Acrylamid	15,00 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,21 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,8	0,37 M
Glycerin (87 %)	5,00 % (v/v)
SDS	0,10 % (w/v)
APS	0,10 % (w/v)
TEMED	0,10 % (w/v)

*aqua bidest.*

*Probenpuffer (4-fach)*

	200,00 mM
Tris/HCl pH 6,8	4,00 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	4,00 % (v/v)

SDS	40,00 % (v/v)
Glycerin	0,01 % (w/v)
Bromphenolblau	
<i>aqua bidest.</i>	

<i>Elektrophoresepuffer</i>	0,20 M
Glycin	25,00 mM
Tris	0,10 % (w/v)
SDS	
<i>aqua bidest.</i>	

*Rainbow™ protein molecular weight marker (MW 220-14,3 kDa; 46.000-2,35 kDa)*

Myosin (MW 220.000 kDa)	1,4 mg/ml
Phosphorylase b (MW 97.400 kDa)	1,4 mg/ml
BSA (MW 66.000 kDa)	1,4 mg/ml
Ovalbumin (MW 46.000 kDa)	1,4 mg/ml
Carboanhydrase (MW 30.000 kDa)	1,4 mg/ml
Trypsin-Inhibitor (MW 21.500 kDa)	1,4 mg/ml
Lysozym (MW 14.300 kDa)	1,4 mg/ml
in 50 %iger Glycerin-Lösung	

#### 4.2.4 Coomassie Blue-Färbung

Die Polyacrylamid-Gele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine zu deren Immobilisierung und Anfärbung auf dem Schwenktisch für mindestens 2 h in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Zur Reduktion des Hintergrundes wurde dann mit einer Entfärberlösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Trocknung wurde das Gel in einem Rahmen ÜN zwischen zwei Zellophanfolien gespannt.



*Coomassie-Lösung*

Coomassie Blue                      1 % (w/v)

Methanol                              40 % (v/v)

Essigsäure                            10 % (v/v)

*aqua bidest.*

*Entfärber*

Essigsäure                            10% (v/v)

Methanol                              40% (v/v)

*aqua bidest.*

**4.2.5 Autoradiographie**

Die Autoradiographie wird allgemein zur Darstellung radioaktiv markierter Proteine eingesetzt. Hierbei werden die Proteine, wie unter 4.2.3 beschrieben, aufgetrennt und das Gel im Vakuum für 4 h auf einem Filterpapier fixiert und getrocknet. Das so immobilisierte, radioaktive Protein wurde in einer geeigneten Kassette ÜN einem Röntgenfilm exponiert und dieser nach Standardmethode entwickelt.

**4.3 Zellbiologische Methoden****4.3.1 Zellkulturtechniken***4.3.1.1 Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten*

Die adhärent wachsenden humanen Zellkulturen wurden in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 10 % FKS enthaltendem DMEM-Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens im Verhältnis 1:3 geteilt.

Zur Passagierung wurden die Zellen nach dem Abnehmen des Kulturmediums mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen, dann mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (15 min auf dem Schwenktisch), um in dem gewünschten Verhältnis auf neue mit Kulturmedium versehene Flaschen verteilt zu werden. Für die Transfektions- und Infektionsversuche mit anschließender Immunfluoreszenz erfolgte die Kultivierung in 60 cm<sup>2</sup>-Petrischalen oder 6-Well-Kulturschalen auf Glasplättchen.

*Kulturmedium* siehe 3.11.

*Trypsin/EDTA-Lösung*

Trypsin, 0,25 % (w/v) 20 ml

EDTA-Lösung 80 ml

*EDTA-Lösung*

EDTA-Na<sub>2</sub> 0,50 mM

Natriumchlorid 0,14 mM

Kaliumchlorid 0,26 mM

di-Natriumhydrogenphosphat 6,50 mM

Kaliumhydrogenphosphat 1,50 mM

*4.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von eukariotischen Zellen*

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Zum Einfrieren wurden subkonfluente Zellkulturen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (s. 4.3.1) und in Folge 3 ml FKS zur Inaktivierung des Trypsins zugegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 750 rpm und Raumtemperatur sedimentiert (Rotina 48R). Das Sediment wurde in 1 ml DMEM/5x10<sup>6</sup> Zellen (4°C) mit 40% FKS aufgenommen und mit dem entsprechenden Volumen DMEM mit 20 % DMSO (4°C) versetzt. Diese Suspension wurde in Aliquots zu je 1 ml in Cryoröhrchen übertragen, die Röhrchen in das mit Isopropanol beschickte Cryo-Einfriergerät (Qualifreeze) gegeben und zunächst bei -80°C für 24 h langsam eingefroren, um anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt zu werden.

Zum erneuten Anzüchten der eingefrorenen Zellen wurden diese nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff sofort im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 5 ml Kulturmedium ausgesät.

*Kulturmedium (DMEM)* siehe 3.11.

#### 4.3.2 Virusvermehrung

Die Vermehrung von HCMV (Toledo, AD 169) erfolgte in auf Grund der Wirtsspezifität in humanen Fibroblastenkulturen. Es erfolgte eine Infektion der konfluent gewachsenen Zellen (siehe Kap. 4.3.5.) durch Zugabe von Virus mit einer Multiplizität der Infektion (m.o.i.) von 0,1. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> so lange inkubiert, bis 50 % der Zellen einen cytopathischen Effekt (CPE) aufwiesen. Nach dem Wechsel des Kulturmediums wurde der Ansatz weitere vier Tage inkubiert, bis der CPE in allen Zellen sichtbar war. Mittels eines Teflon-Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und anschließend mit dem Kulturüberstand für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Rotina 48R, Hettich, Tuttlingen). Dieser Schritt diente der Sedimentation der Zellbestandteile. Der Überstand wurde als Virusstammsuspension in 2 ml-Aliquots bei –80°C gelagert oder für die Virusanreicherung (siehe Kap. 4.2.3.) verwendet. Die Zellsedimente wurden in 200 µl PBS resuspendiert und ebenfalls bei –80°C eingefroren.

*Kulturmedium* siehe 3.11

*PBS-Puffer* siehe 3.12

#### 4.3.3 Virusanreicherung

Zur DNA-Präparation wurde das Virus aus dem zellfreien Kulturüberstand nach der Virusernte (siehe Kap. 4.2.2.) ankonzentriert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 28 000 rpm für 5 Stunden in einer Ultrazentrifuge (L7-55, Beckman, Frankfurt). Die sedimentierten Viren aus 80 ml Kulturüberstand wurden vereinigt, in 200 µl PBS-Puffer aufgenommen und bei –80 °C gelagert.

*PBS-Puffer* siehe 3.12

#### 4.3.4 Virustitration nach der Endpunktverdünnungsmethode

Zur Bestimmung der infektiösen Einheiten des virushaltigen Kulturüberstandes wurde eine doppelte logarithmische Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$  in Kulturmedium) angesetzt. Konfluente Deckglaskulturen von Fibroblasten wurden mit diesen Verdünnungen infiziert (siehe Kap. 4.2.5.) und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch den Nachweis

von im Zellkern lokalisiertem HCMV-IE 1 (immediate early 1)-Virusantigen mittels indirekter Immunfluoreszenz (siehe Kap. 4.3.1.) unter Verwendung eines monoklonalen anti-IE 1 Antikörpers (mab IE) erfolgte die Ermittlung des Virustiter. Die durchschnittliche Anzahl der infektiösen Einheiten der Stammsuspension (n) ermittelt sich aus der letzten Verdünnung ( $10^{-x}$ ), in der noch wenige Kerne (y) in der Immunfluoreszenz positiv sind, nach der Formel:

$$n = y \times 10^x.$$

#### 4.3.5 Experimentelle Virusinfektion

Für die Infektion von humanen Fibroblasten wurden die konfluenten Zellen mit einem HCMV-Stamm (Toledo bzw. AD 169) der gewünschten Multiplizität versetzt und für eine Stunde auf einem Schwenker bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum durch Kulturmedium mit 10% (v/v) FKS ersetzt.

*Kulturmedium*

siehe 3.11.

### 4.4 Immunologische Methoden

#### 4.4.1 Immunisierung und Gewinnung des Immunerums

Zur Detektion von pUL142 wurde von der Firma Eurogentec ein Kaninchen-Immuneserum bezogen, für dessen Herstellung zwei kurze, lineare und immundominante Peptidpitope, die den Aminosäuren 84-98 und 297-306+C des pUL142 (s. Abb. 2.1) entsprechen und auf Anraten von Herrn Prof. Garten, Institut für Virologie Marburg, ausgewählt wurden, gleichzeitig verwendet wurden. Dazu wurde ein Kaninchen mit den synthetisch hergestellten Peptiden immunisiert und nach erfolgter Immunreaktion das Serum entnommen.

Um im Versuchstier, in diesem Fall ein Kaninchen, eine adäquate Immunreaktion hervorzurufen, wurde das aggregierte Peptidpitop zusätzlich mit Freund'schem Adjuvans versehen. Bei der primären Immunisierung wurde zu 500 µl Peptidgemisch 500 µl Freund'sches Adjuvans complete, welches M-tuberculosis Oberflächenproteine enthielt, zugegeben. Die Injektion mit jeweils 300 µl der Injektionslösung erfolgte subkutan an den Flanken des Tieres. Nach 3 Wochen wurde zur Verstärkung der

Antikörperproduktion ein erstes Mal geboostet. 14 Tage nach dem ersten Boost konnten 10 ml Blut aus den Ohr-Venen des Kaninchens entnommen werden.

Nach 10 minütigem Abzentrifugieren bei 3800 rpm und 4 °C konnte das Serum als Überstand abgenommen werden. Das Serum konnte nun an infizierten Zellen und im Immunoblot auf Spezifität getestet werden.

#### **4.4.2 Affinitätsreinigung fragment-spezifischer Antikörpern aus dem Immuns serum**

Zur Aufreinigung fragmentspezifischer Antikörpers aus dem Immuns erum wurden die Fragmente F1 und F2 des pUL142 getrennt voneinander bakteriell expriert und isoliert (s. 4.2.2.1).

60 µg gereinigtes Fusion-Protein wurden durch SDS-PAGE (15%) elektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.2.3) und anschließend durch Blotten auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert (s. 4.4.6). Die Protein-Bande wurde durch 2-minütiges Färben mit Ponceau-Lösung (RT) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Der Membran-Streifen wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen ÜN in 3 % BSA-Puffer inkubiert. Nach 3 x 5 min waschen mit PBS mit 0,1% Tween20 wurde die Membran mit 1,5 ml Immuns erum 1:5 in BSA-Puffer ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBS/0,1% Tween20 und 1x10 min mit *aqua bidest.* wurde der gebundene Antikörper für 2 min mit 500 µl Glycin-Puffer pH 2,8 (4°C) eluiert. Das Eluat wurde auf Eis mit 1,5 µl 1,5 M TrisHCl pH 8,8 auf einen neutralen pH-Wert gebracht. In einem zweiten Eluationsschritt wurden für 5 min 500 µl Glycin-Puffer pH 2,2 (4°C) zugegeben und ebenfalls auf Eis mit 4 µl 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 neutralisiert. Die beiden Fraktionen wurden vereinigt und der pH-Wert auf Neutralität getestet. Das Eluat wurde auf 5% BSA eingestellt und bei 4°C gelagert.

*PBS*

s. 3.12

*3% BSA-Puffer*

s. 4.4.1.1

*Ponceau-Lösung*

Ponceau-Reagenz 0,1 % (w/v)

Essigsäure 1,0 % (v/v)

*aqua bidest.*

*Glycin-Puffer*

Glycin 5,0 mM

NaCl 500,0 mM

*aqua bidest.*

Die Einstellung des Glycin-Puffers auf den entsprechenden pH-Wert von 2,2 bzw. 2,8 erfolgte mit HCl unmittelbar vor dessen Verwendung.

**4.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz**

Immunfluoreszenzen dienen zum Nachweis antigener Strukturen in infizierten oder transfizierten Zellen durch fluoreszenz-markierte Antikörper. Die durchgeführte indirekte Immunfluoreszenz basiert auf der Fluoreszenz eines gebundenen Zweitantikörpers. Das Antigen wird zunächst durch einen spezifischen Erstantikörper detektiert. Der anschließend zugegebene Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zweitantikörper wiederum bindet an den ersten und fluoresziert bei der Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge. Diese Fluoreszenz kann mit Hilfe eines geeigneten Mikroskops als indirekter Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden.

*4.4.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz nach Methanol/Acetonfixierung*

Die auf den Deckgläschen gewachsenen infizierten oder transfizierten Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und darauf folgend in einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton (-20°C) fixiert und permeabilisiert. Nach dem Entfernen und Abdampfen des Fixierungsmittels für mindestens 30 min bei RT wurden die Zellen in BSA-Puffer 15 min in einer feuchten Kammer rehydriert. Es folgte eine Inkubation für 45 bis 60 min mit einem spezifischen in BSA-Puffer verdünnten Erstantikörper in einer feuchten Kammer mit anschließendem Waschen des Deckgläschens in PBS-Puffer. Die Deckgläschen wurden dann weitere 30 min mit einem fluoreszenzgekoppelten, in BSA-Puffer verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und erneut in PBS-Puffer, danach zur

Verhinderung der Bildung von Salzkristallen in aqua bidest. gewaschen und auf einen Objektträger in Fluoroprep™ (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eingedeckt, kurz getrocknet und zum Schutz vor Austrocknung mit Corbitbalsam (Hecht, Kiel) abgedichtet.

#### *BSA-Puffer*

BSA	3,00 %(w/v)
Natriumacid	0,02 %(w/v)
Natriumchlorid	200,00 mM
PBS-Puffer	

*PBS-Puffer* siehe 3.12.

#### **4.4.4 Doppelimmunfluoreszenz**

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz können unterschiedliche Proteine in einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Diese Methode diente in dieser Arbeit zur Infektionskontrolle. Die Durchführung erfolgte analog zum Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz (siehe Kap. 4.4.3). Die infizierten und fixierten Zellen wurden nacheinander mit zwei Primärantikörpern, die in verschiedenen Tierspecies gewonnen wurden, inkubiert. Zur Detektion wurden gleichzeitig entsprechende speciesspezifische Sekundärantikörper mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung eingesetzt.

#### **4.4.5 Adsorption von Immuns serum mit Acetonpräzipitaten aus Zellkulturen**

Um unspezifische Bindungen der im Western-Blot verwendeten Humanseren an bakteriellen Proteinen auszuschließen, wurde eine Adsorption mit aus bakteriellen M15-Zellen gewonnenem Acetonpulver durchgeführt.

##### *4.4.5.1 Herstellung eines Acetonpulvers*

Eine 100 ml E.coli-M15 Kultur wurde bei 4°C für 5 min und 3400 rpm (Rotina 48R) abzentrifugiert und das Sediment mit PBS<sup>++</sup> + Proteaseinhibitoren (PMSF und Trasylol) gewaschen, um erneut bei oben genannten Bedingungen sedimentiert zu werden. Das Sediment wurde in 5 ml PBS<sup>++</sup> + Proteaseinhibitoren aufgenommen und mit Aceton (-

20°C) in einer Endkonzentration von 90 % versetzt. Das Gemisch wurde ÜN bei –20°C inkubiert

In Folge wurden die Zellen bei 3400 rpm über 10 min sedimentiert Rotina (48R), der Überstand verworfen und das Pellet bei RT für 2 h getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde mit einem Eppendorf-Mörser zu Pulver zerstoßen.

*PBS<sup>++</sup> pH 7,4*

s. 4.3.3.2

*PBS<sup>++</sup> + Proteaseinhibitoren*

PMSF

1: 200 (Stocklösung in Ethanol)

Trasylol

1:1000 (Stocklösung in *a.bidest.*)

#### 4.4.5.2 Adsorption des Immunsersums

Die Adsorption der Immunsereen erfolgte ÜN bei 4°C. Zu 600 µl Serum wurde das Acetonpulver aus einer 100 ml-Bakterienkultur gegeben und ÜN rotierend inkubiert. Anschließend wurde das Acetonpulver bei 13000 rpm für 2 min sedimentiert (Biofuge pico), der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

#### 4.4.6 Immunoblot

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose wird als Blotverfahren bezeichnet. Die Übertragung erfolgte in dieser Arbeit entweder im Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) oder dem Naßblotverfahren nach Towbin et al. (1979).

Auf diese Weise immobilisierte Proteine können mittels Antikörpern spezifisch detektiert werden. Das eingesetzte Verfahren beruht auf der Verwendung eines gebundenen, proteinspezifischen Primärantikörpers und eines enzymgekoppelten Sekundär-antikörpers, dessen Lokalisation durch anschließende enzymatische Substratumsetzung in Anwesenheit eines Chromogens sichtbar gemacht wird.

##### 4.4.6.1 Blotten von SDS-Polyacrylamidgelen (Halbtrockenblot)

Zwischen zwei horizontalen Graphit-Plattenelektroden wurden von Kathode zur Anode 3 in Roti<sup>®</sup>-Blot K-Puffer (Roth GmbH, Karlsruhe) getränkte Filterpapiere, das Gel, die



in Wasser eingeweichte Nitrocellulose-Membran und 3 in Roti<sup>®</sup>-Blot A-Puffer (Roth GmbH, Karlsruhe) getränkte Filterpapiere blasenfrei übereinander-geschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte bei RT und konstanter Stromstärke von 0,8-1,0 mA/cm<sup>2</sup> Blotfläche über 90 min.

#### *Anodenpuffer*

Roti<sup>®</sup>-Blot-A 10% (v/v)

Methanol 20% (v/v)

*aqua bidest.*

#### *Kathodenpuffer*

Roti<sup>®</sup>-Blot-K 10% (v/v)

Methanol 20% (v/v)

*aqua bidest.*

Zu den Bestandteilen des Roti<sup>®</sup>-Blot K-Puffers und Roti<sup>®</sup>-Blot A-Puffers macht der Hersteller keine Angaben.

#### *4.4.6.2 Blotten von SDS-Polyacrylamidgelen (Naßblot)*

SDS-Polyacrylamidgele der Größe 12x17,5 cm wurden hierbei blasenfrei auf eine zuvor für 15 min in Transferpuffer eingelegte Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,1 µm) adaptiert und zwischen Lagen aus Filterpapier vertikal in eine Kunststoff-Transferkammer eingespannt und vollständig mit Transferpuffer bedeckt. Es wurde bei 4°C eine Stromstärke von 300 mA für 16 h angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel dem Stromfluß folgend auf die Nitrocellulosemembran übertragen und somit auf dieser immobilisiert wurden.

#### *Transferpuffer*

Glycin 150,0 mM

Methanol 20,0 % (v/v)

Tris 20,0 mM

*aqua bidest.*

#### 4.4.6.3 Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungen in BSA-Puffer oder Blot-Puffer in einer 10 %igen (w/v) Magermilchpulverlösung in PBS/ 0,1 % Tween<sup>®</sup> 20 über Nacht inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte von je 5 min in Blot-PBS mit 0,1 % (v/v) Tween<sup>®</sup> 20. Die Membran wurde nun für mindestens eine Stunde mit einem in Puffer 2 verdünnten spezifischen Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Puffer 4 für 5 min folgte ein Inkubationsschritt der Nitrocellulosemembran mit einem im Verhältnis 1:300 in Puffer 2 verdünnten peroxidasegekoppelten Zweitantikörpers für eineinhalb Stunden. Die Darstellung der spezifischen Banden erfolgte durch Zugabe einer chloronaphtolhaltigen Färbelösung.

##### *BSA-Puffer*

BSA	3,00 %(w/v)
Natriumazid	0,02 %(w/v)

##### *Blot-PBS pH 7,4(Blot-PBS)*

Natriumchlorid	200,0 mM
PBS pH 7,4	

##### *Puffer 2*

BSA	3,0 %(v/v)
FKS	5,0 %(v/v)
Tween <sup>®</sup>	0,1 %(v/v)
Natriumchlorid	200,0 mM
PBS pH 7,4	

*Puffer 4*

Tween <sup>®</sup>	0,3 %(v/v)
Natriumchlorid	300,0 mM
PBS pH7,4	

*PBS* siehe 3.12.

*Färbelösung*

4-Chloro-1-naphtol	0,3 mg/ml
DMSO	10,0 % (v/v)
Blot-PBS	90,0 % (v/v)
30 %iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,0 µl/ml

Das 30 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde unmittelbar vor Gebrauch der Färbelösung zugesetzt.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit *aqua bidest.*.

## 4.5 Computeranalysen

Zur Identifizierung von potenziellen Glycosylierungsstellen anhand der deduzierten Aminosäuresequenz des UL142-Proteins wurde das HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources)-Computerprogrammpaket (Version 4.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ), Heidelberg, eingesetzt.

Die Datenbanksuche nach ähnlichen Proteinen zu UL 142 erfolgte mittels der Programme BLASTP und BLASTN, Version 2.0.10 (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

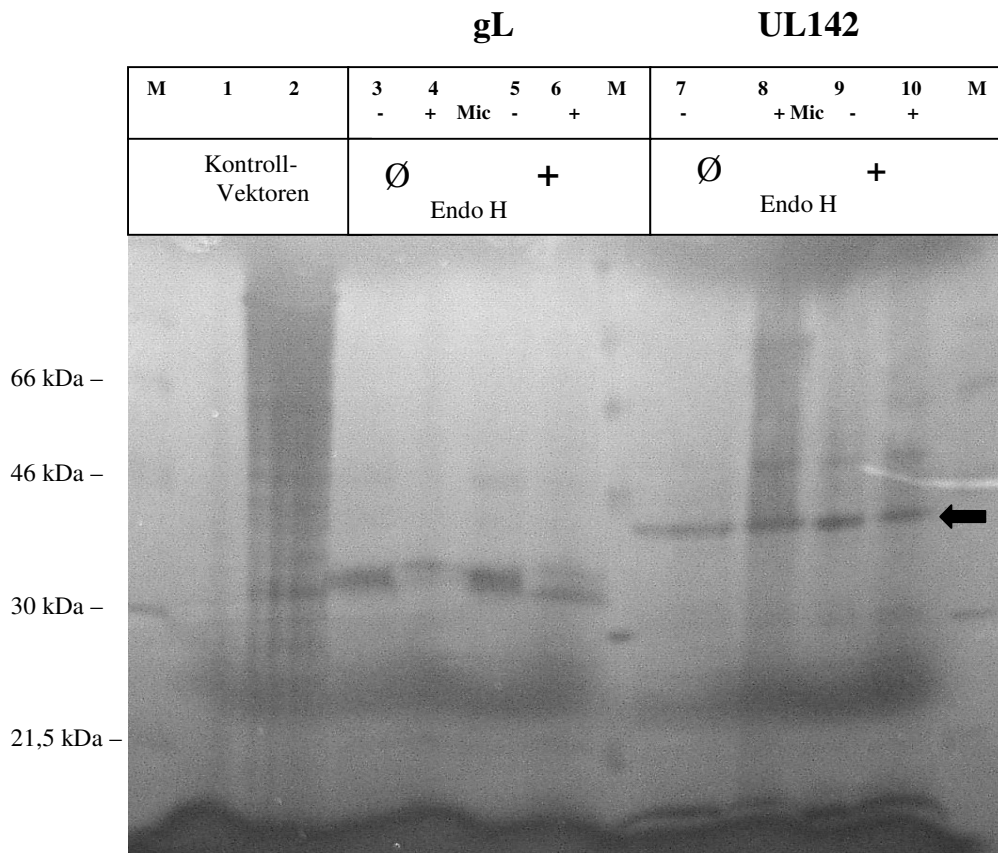
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Überprüfung der Glykosylierung des pUL142 mittels *in vitro* Translation

Für das Genprodukt des ORF UL142 (pUL142) wird in der deduzierten Aminosäuresequenz ein potentielles Glykoprotein mit 20 Glykosylierungsstellen vorhergesagt (Cha et al., 1996). Da dieses Genprodukt für immunologische Nachweise im prokaryotischen System exprimiert werden sollte, musste zunächst der tatsächliche Glykosylierungsstatus im eukaryotischen System geklärt werden. Hierfür wurde eine *in vitro* Translation unter Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin durchgeführt. Durch den weiteren Zusatz von Hundepankreas-Mikrosomen sollte eine kotranslationale Glykosylierung der Genprodukte ermöglicht werden. Als Matrizen-DNA kamen zum einen pcDNA3.*lmyc/hisA*-gL (s. 3.15.1) als Positivkontrolle für ein nachweislich glykosyliertes Protein (Glykoprotein L (gL) des HCMV) und zum anderen das Konstrukt pcDNA3.*lmyc/hisA*-UL142 (s. 3.15.1) zum Einsatz, mit Hilfe dessen die Glykosylierung des pUL142 untersucht werden sollte. Durch anschließende Behandlung der Produkte mit Endoglykosidase H (EndoH) sollte der Glykosylierungsstatus überprüft werden. Abb. 5.1 zeigt für das Kontrollprotein (gL) den erwarteten Anstieg des Molekulargewichts von ca. 31 kDa auf ca. 32 kDa nach der Glykosylierung mittels Mikrosomen (vergleiche Spuren 3 und 4 in Abb. 5.1). Nach Inkubation mit Mikrosomen und anschließender Behandlung mit EndoH ist eine Doppelbande zu erkennen (Spur 6), wobei eine Bande im Vergleich zum nicht glykosylierten Produkt (Spur 5) ein erhöhtes, die andere ein identisches Molekulargewicht aufweist (Spur 6). Diese Doppelbande ist darauf zurückzuführen, dass durch EndoH die Deglykosylierung nur teilweise erfolgt, das Protein in dieser Spur also in glykosylierter wie auch deglykosylierter Form vorliegt.

Im Falle des pUL142 sind in allen Spuren (Abb. 5.1, Spuren 7-10) gleichermaßen Banden bei ca. 35 kDa zu erkennen (Pfeil), die dem erwarteten Molekulargewicht des pUL142 entsprechen. Es kann somit angenommen werden, dass das Protein vollständig synthetisiert wurde. Das Ergebnis, dass die Produkte aller Ansätze ein identisches Laufverhalten zeigen, weist weiterhin darauf hin, dass pUL142 unter den verwendeten Bedingungen im eukaryotischen System nicht durch kotranslationale Glykosylierung modifiziert wird. Bei pUL142 handelt es sich offenbar nicht um ein Transmembran-

bzw. sekretorisches Glykoprotein, deren bakterielle Expression mitunter problematisch ist.



**Abb. 5.1 *In vitro* Translation der Konstrukte pcDNA3.1-myc/hisA-UL142 und-gL**

30 µl der *in vitro* Translationsprodukte wurden im 12 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Produkte des gL-Konstruktes befinden sich in den Spuren 3-6 (31 kDa) und die des UL142 in den Spuren 7-10. Die Spuren 4, 6, 8 und 10 zeigen die Reaktionsansätze mit Mikrosomen (Mic +), alle anderen wurden ohne Zusatz von Mikrosomen durchgeführt. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurden unter M jeweils 4 µl <sup>14</sup>C-markierter Rainbowmarker (14,3-220 kDa) aufgetrennt. Der Pfeil kennzeichnet die Bande von ca. 35 kDa, die das pUL142 darstellt.

## 5.2 Expression und Darstellung des F1-Fragmentes des pUL142

### 5.2.1 Herstellung eines UL142-spezifischen polyklonalen Antikörpers im Kaninchen

Zur Detektion von pUL142 wurde bei der Firma *Eurogentec* ein Immunsereum in Auftrag gegeben. Für dessen Herstellung wurden auf Empfehlung von Herrn Prof. Garten (Institut f. Virologie, Marburg) zwei potentiell antigene Bereiche des pUL142, die Peptidsequenzen AS 94-98 und 297-306 (s. Abb. 2.1), zur Immunisierung eines

Kaninchens (s. 4.4.1) ausgewählt. Die Kaninchen wurden mit beiden Peptiden gleichzeitig immunisiert. Zur getrennten Aufreinigung eines N-terminal und eines C-terminal bindenden Antikörpers aus dem erhaltenen Immuns serum K414 wurden (s. Schema Abb. 2.1) die N- (AS 1-152 = F1) und die C-terminale (AS 153-306 = F2) Hälfte des Proteins getrennt bakteriell exprimiert.

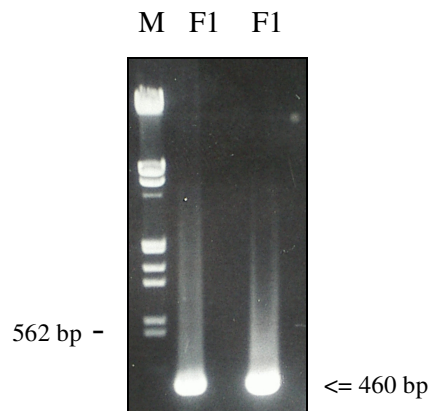
### **5.2.2 Subklonierung und Expression der pUL142-Fragmente**

Die Klonierung der kodierenden DNA-Fragmente erfolgte in das prokaryotische Expressionskonstrukt pQE-30, das die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem sechsfachem His-Tag ermöglicht. Dadurch lassen sich die Proteine über Ni-NTA-Agarose aufreinigen, da der sechsfache Histidin-Tag, wie in 4.2.2.2 beschrieben, an Ni-NTA-Agarose bindet .

Das F2 lag bereits aufgereinigt vor und die Spezifität einer affinitätsgereinigten Antikörperfraktion aus dem Vollserum war bereits nachgewiesen worden (Diplomarbeit A. Dittmer, 2002).

#### *5.2.2.1 Subklonierung des UL142-F1*

Das 460 bp große N-terminale DNA-Fragment F1 des UL142, welches die Basenpaare 1-460 des UL142 umfasst, wurde mittels PCR (4.1.9) amplifiziert. Dafür wurde als DNA-Matrize 500 ng des Vektors pcDNA3.1(-)Myc/His-A-UL142, der den ORF UL142 des HCMV-Stammes Toledo enthält, (s. 3.15.1) eingesetzt. Die Oligonukleotide UL142/F1-hin und -rück (s. 3.16) dienten als Primer für die Amplifikation der gewünschten Bereiche. 10 µl dieses Ansatzes wurden nach Beendigung des Zyklus mit 2 µl DNA-Probenpuffer versetzt und im 1 %igen Agarosegel analysiert (s. 4.1.4). Das Ergebnis ist in Abb. 5.2 dargestellt. Die Proben enthielten DNA-Fragmente der gewünschten Größe von 460 bp und wurden, wie unter 4.2.5 angegeben, gereinigt (s. 4.1.10.2) und anschließend in 30 µl EB-Puffer aufgenommen, um sie in der folgenden Ligation (s. 4.1.6) einzusetzen.



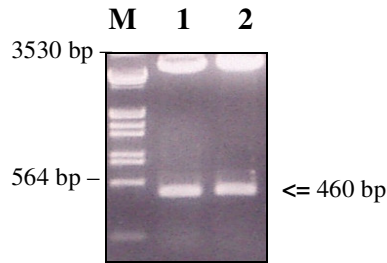
**Abb. 5.2 Amplifikation des Fragments F1 mittels PCR**

Das über PCR amplifizierte Fragment F1 (rechter Pfeil bei 460 bp in den Spuren F1) wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurden 2  $\mu$ l des Roche DNA-Markers III mit aufgetragen (Spur M). Die Position des Markerfragments bei 562 bp ist auf der linken Seite markiert.

Die 460 bp großen PCR-Amplifikate des F1 sowie 5  $\mu$ g des Vektors pQE-30 wurden jeweils in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und PstI über einen Zeitraum von 2 h bei 37 °C inkubiert (s. 4.1.3). Der so linearisierte Vektor wurde anschließend dephosphoryliert. Zum Entfernen der Restriktionsenzyme und Konzentrierung der restringierten DNA-Fragmente erfolgte erneut eine Reinigung mit anschließender LiCl-Fällung (s. 4.1.1). Die pelletierte DNA wurde in 10  $\mu$ l *aqua bidest.* aufgenommen.

Zur Kontrolle der vorhandenen DNA-Menge und der Größe der Insert-DNA wurde 1  $\mu$ l der Fragmente und des Vektors elektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.2.8).

Für die Ligation (s. 4.1.6) wurden 1  $\mu$ l des Vektors und je 5  $\mu$ l der Fragmente eingesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* XL1-Blue und Selektion auf LB-Agarplatten<sup>amp</sup> wurde die Plasmid-DNA einzelner Klone präpariert (s. 4.1.1.1). Die Insertion des Fragmentes F1 wurde mittels Restriktion durch o.g. Restriktionsendonukleasen und anschließender Agarosegelelektrophorese (Abb. 5.3) überprüft. Positive Klone wurden im großen Maßstab kultiviert und deren DNA wie unter 4.1.1.2 beschrieben präpariert.



**Abb. 5.3 Agarosegel-Auftrennung zweier pQE30-F1 Konstrukte nach Ligation und anschließender Kontrollrestriktion mit den Endonukleasen BamH1 und PstI**

Der Pfeil auf der rechten Seite kennzeichnet das 460bp große F1-Fragment des Konstruktes pQE30-F1 (Spuren 1+2). Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Molekulargewichtsmarker (Marker III, Roche) unter M aufgetragen. Die Positionen der Markerfragmente mit 564 bp und 3530 bp sind auf der linken Seite gekennzeichnet.

#### 5.2.2.2 Überprüfung der korrekten Insertion durch Sequenzierung

Die Nukleotidsequenzen positiver Klone wurden durch Sequenzierung mit den zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotiden analysiert (4.1.10). Der Vergleich zu der publizierten Sequenz (Cha et al., 1996) ergab keinen Hinweis auf Mutationen.

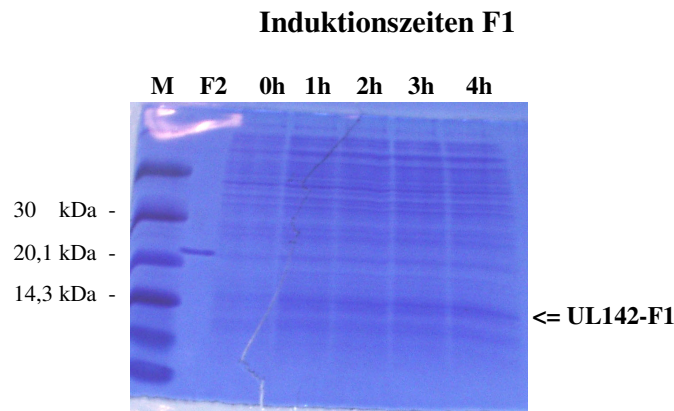
#### 5.2.2.3 Prokaryotische Expression des pUL142-F1

Nachdem die korrekte Insertion des UL142-F1 Genabschnittes in den prokaryotischen Expressionsvektor nachgewiesen werden konnte (s. 5.2.2.1/5.2.2.2), wurde das Plasmid pQE-30-F1 in kompetente Zellen des Bakterienstammes *E. coli* M15 eingebracht (4.1.7). In einem Vorversuch sollte geklärt werden, ob pUL142-F1 in den Bakterienzellen stabil exprimiert wird. Hierfür wurde eine mit pQE-30-F1 transformierte Bakterienkultur in 50 ml LB-Medium<sup>Amp+Kan</sup> (s. 3.11) bis zu einer OD von 0,7-0,9 herangezogen und dann mit 1,5 mmol IPTG die Expression des Fusionsproteins induziert (s. 4.2.2.1). Unmittelbar vor und 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Induktionsbeginn wurden 1 ml Proben der Bakterienkultur zur Analyse im Immunoblot und der Coomassie-Färbung entnommen.

Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte durch Auftrennung von 30 µl der Bakterienlysate in einem 15 %igen Polyacrylamid-Gel (4.2.3). In der anschließenden Coomassie-Färbung (4.2.4) war ab 1 h nach Induktionsbeginn eine schwache Bande im Vergleich zu der Probe vor Induktion im Bereich von etwa 17 kDa (Pfeil) zu erkennen, die dem erwarteten Molekulargewicht des F1 (15 kDa) entsprach (Abb. 5.4). Das



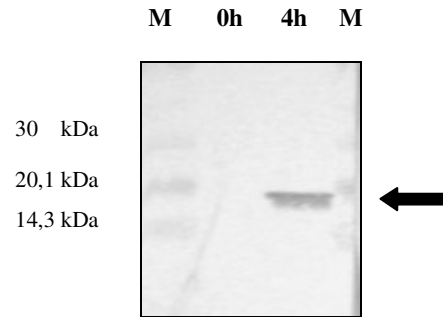
Fusionsprotein konnte somit in *E.coli* exprimiert werden, wobei die Expressionseffizienz jedoch relativ niedrig war.



**Abb. 5.4 Überprüfung der Expression des UL142-F1 spezifischen Fragments**

Das Fusionsprotein F1 wurde bakteriell über unterschiedliche Zeiträume exprimiert. Je 30 µl der Bakterienlysate wurden im 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *Coomassie Blue* gefärbt. Der Pfeil kennzeichnet eine Bande bei ca.17 kDa, die dem erwarteten Molekulargewicht des F1 entspricht. Unter F2 wurde das bereits aufgereinigt vorliegende pUL142-F2 (5 µl) aufgetrennt (\* 22 kDa). Der Molekulargewichtsmarker M wurde mit angefärbt.

Der spezifische Nachweis des Proteins erfolgte im anschließenden Immunoblot. Hierzu wurden 30 µl der lysierten Bakterienkulturen in einem 15 % SDS-Gel aufgetrennt (s. 4.2.3) und wie unter 4.4.6.1 beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In der Westernblotanalyse wurde ein anti-His-Erstantikörper, der in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % Milchpulver eingesetzt wurde und durch einen HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus Zweitantikörper (1:300) detektiert wurde, eingesetzt. Die Bande für das Fusionsprotein (ca. 17 kDa) konnte durch anschließende Chloronaphthol-Färbung (s. 4.4.6.3) sichtbar gemacht werden (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5 Nachweis des Fusionsproteins pUL142-F1 mittels His-Antikörper im Immunoblot**

Es wurden 30 µl von Lysaten nicht induzierter (Spur 0 h) und für 4 Stunden induzierter Bakterien (Spur 4 h) im 15 % SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der spezifische Nachweis erfolgte im Immunoblot unter Verwendung eines Erstantkörpers, der den His-Tag des rekombinanten Proteins erkennt. Der Pfeil auf der rechten Seite markiert die Bande auf Höhe von 17 kDa. M bezeichnet die Spur mit Markerproteinen, deren Größe auf der linken Seite angegeben ist.

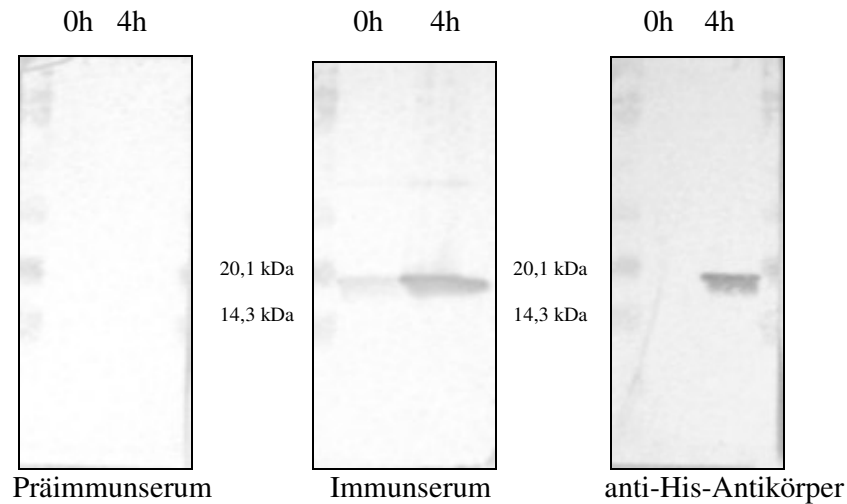
#### 5.2.2.4 Überprüfung der Reaktivität des Peptid-Antikörpers mit dem pUL142-F1

Nachdem die erfolgreiche Expression des pUL142-F1 nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob das Serum des mit den UL142-spezifischen Peptiden immunisierten Kaninchens Spezifität gegenüber dem Protein aufweist.

Hierzu wurden 30 µl der Proben aus den nicht induzierten Bakterienkulturen und aus den entsprechenden Kulturen 4 h nach Induktion im 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Halbtrockenblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um im Immunoblot untersucht zu werden (Abb. 5.6).

Als Erstantikörper gegen das Fragment F1 wurde das Kaninchen-Immunsereum 414 (K414) in einer Verdünnung von 1:250 verwendet. Als Negativkontrolle diente das Präimmunsereum desselben Kaninchens in gleicher Verdünnung, welches keine pUL142-F1-spezifischen Antikörper enthalten sollte. Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppeltes Schwein-anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:300 verwendet. Als Positivkontrolle diente der anti-His-Antikörper aus der Maus (1:1000) und als Zweitantikörper ein Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper (1:300).

Sowohl das Peptidserum als auch der His-Antikörper führte zur spezifischen Anfärbung einer Bande mit dem für das pUL142-F1 erwartete Molekulargewicht von ca 17 kDa (Abb. 5.6) Im Folgeschritt wurde das Fusionsprotein aufgereinigt.



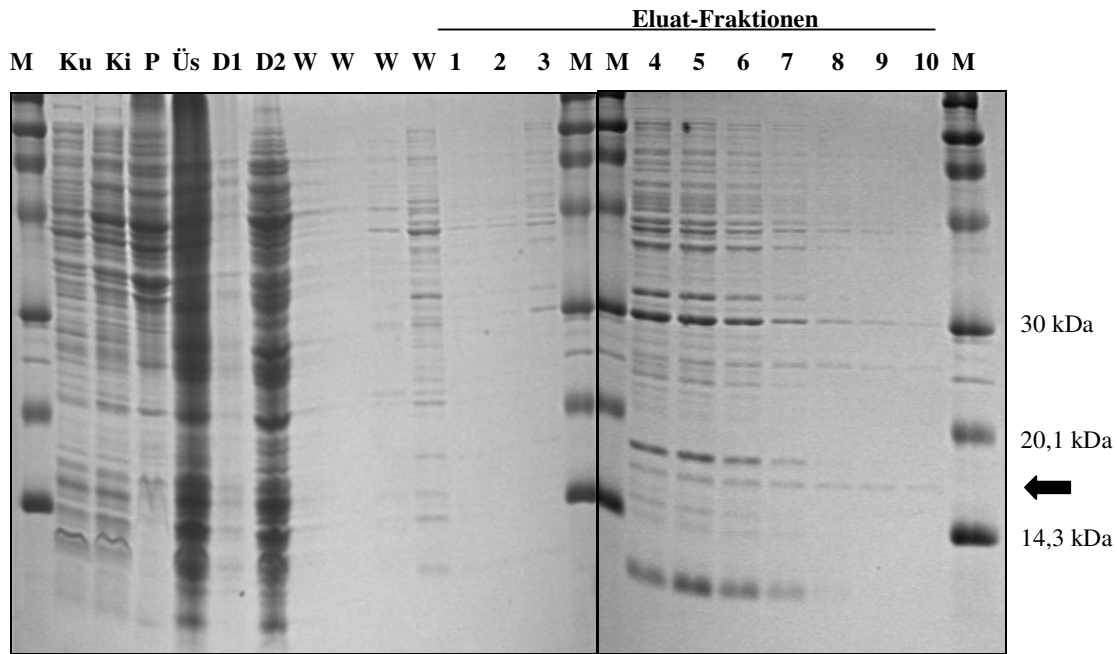
**Abb. 5.6 Immunoblot des Fusionsproteins pUL142-F1**

Aliquots (30 µl) von Lysaten nicht induzierter (0 h) und für 4 h induzierter (4 h) Bakterien wurden im 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der spezifische Nachweis des F1 erfolgte über das Serum des immunisierten Kaninchens (mittlere Abbildung). Als Positivkontrolle diente ein anti-His-Antikörper (rechte Abbildung), als Negativkontrolle das Präimmunserum (linke Abbildung).

#### 5.2.2.5 Aufreinigung des pUL142-F1 mittels Ni-NTA Agarose

Für die folgenden Untersuchungen im Immunoblot wurde das pUL142-F1 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie aufgereinigt.

Dazu wurden pQE-30 F1 transformierte *E. coli* M15 Bakterienzellen, wie unter 4.2.2.2 beschrieben, behandelt. Zur Aufreinigung wurde die Bindung des Fusionsproteins über den sechsfachen Histidin-Tag an die Nickel-NTA-Agarose genutzt. Diese Bindung kann durch Imidazol gelöst und das Fusionsprotein als weitgehend reine Fraktionen eluiert werden. Es wurden 10 Eluatfraktionen zu je 1 ml gewonnen. Von diesen und von den während der Aufreinigung entnommenen Proben wurden 15 µl in einem 15 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend mit *Coomassie Blue* gefärbt. In den Fraktionen 6-10 konnte ein Protein mit dem Molekulargewicht von ca. 17 kDa dargestellt werden (Abb.5.7).

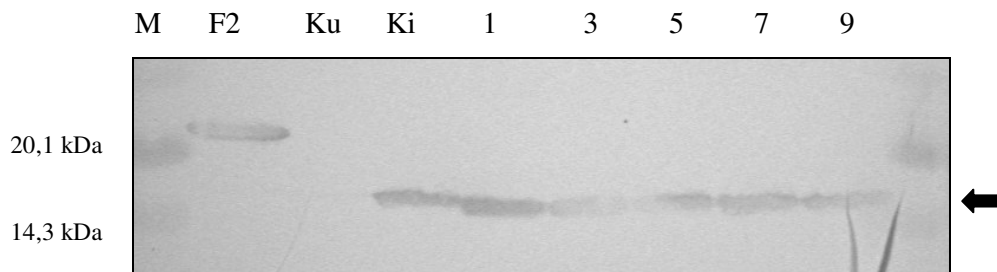


**Abb. 5.7 Coomassie-Blue-Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen**

30 µl der Proben nicht induzierter und induzierter Bakterienkulturen (Ku, Ki), des Pellet P und des Überstand Üs sowie des Überstands nach dem Binden an die Ni-NTA Agarose (D1, D2) wurden im 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit *Coomassie Blue* gefärbt. W kennzeichnet Waschfraktionen zum Ausschwämmen unspezifisch gebundener Proteine. Jeweils 15 µl der 10 Eluatfraktionen wurden unter 1-10 aufgetragen. Der Pfeil auf der rechten Seite kennzeichnet die Position des Fusionsproteins bei 17 kDa. Der Molekulargewichtsmarker M (14,3 – 20,1 – 30 – bis 220 kDa) wurde mit aufgetrennt.

Da in diesen Fraktionen auch andere Proteine angefärbt wurden, wurden zur Identifizierung des pUL142-F1 je 15 µl der eluierten Fraktionen 1, 3, 5, 7, und 9 im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (s. 4.2.3), auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2µm) übertragen (s. 4.4.6.1) und im Immunoblotverfahren (s. 4.4.6.3) analysiert. Dafür kam ein Anti-RGS-HIS-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % Magermilchpulver zur Anwendung, welcher durch einen entsprechenden Zweitantikörper, einen Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper (1:300), erkannt wurde. Eine Proteinbande bei 17 kDa, die der erwarteten Größe des F1 entsprach, wurde in anschließender Chloronaphtholfärbung (s. 4.4.6.3) sichtbar gemacht (Abb. 5.8). Für die weiteren Versuche wurde die Fraktion 7 verwendet.

Das Protein pUL142-F2 lag bereits in aufgereinigter Form vor (Diplomarbeit A. Dittmer 2002).



**Abb. 5.8 Immunoblot der UL142-Fragmente F1 und F2**

Nach Aufreinigung des F1-Proteins durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden je 15 µl der eluierten Fraktionen 1, 3, 5, 7 und 9 sowie des Lysats der induzierten Kultur (Ki) mittels 15 %igen SDS-Paging aufgetrennt und im Immunoblot über einen Maus-anti-RGS-His-Antikörper (1:1000) nachgewiesen. Das bereits vorhandene Konstrukt F2 diente als Positivkontrolle, die nicht-induzierte Probe (Ku; 30 µl) als Negativkontrolle. Der Pfeil markiert Proteinbanden bei dem erwarteten Molekulargewicht des F1 (17 kDa). In Spur M wurden Markerproteine aufgetrennt (14,3 und 20,1 kDa).

### 5.3 Etablierung eines Streifenblotverfahrens für die Untersuchung von Patientenseren

Bevor die Seren von HCMV-positiven Patienten im Immunoblotverfahren getestet werden konnten, musste der getrennte spezifische Nachweis der Fragmente pUL142-F1 und pUL142-F2 etabliert werden. Dieses sollte durch eine Affinitätsreinigung unter Verwendung der beiden Fragmente F1 und F2 erreicht werden.

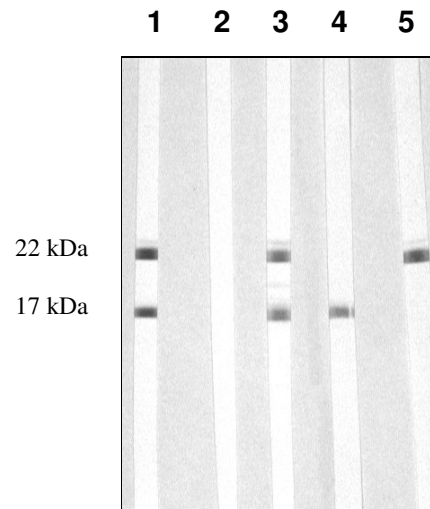
Dazu wurden die aufgereinigten rekombinanten Proteine getrennt voneinander in 15 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet (s. 4.4.6.1). Nach dem Färben der Membranen mit PonceauS-Lösung wurden die sichtbaren Proteinbanden auf Höhe des jeweiligen Proteins ausgeschnitten, mit *aqua bidest.* gewaschen und mit dem Immuns serum K414 ÜN bei 4 °C inkubiert, so dass spezifische Antikörper aus dem Vollserum an das jeweilige Protein binden konnten. Anschließend wurden die monospezifischen Antikörper mittels pH-Shift eluiert, um im Immunoblot (4.4.6) und in der Immunfluoreszenz eingesetzt zu werden (s. 4.4.1).

Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurde ein Immunoblot durchgeführt. Hierzu wurden in einem 15 %igen SDS-Gel (12x17,5 cm) die Proteine F1 und F2 gemeinsam aufgetrennt (s. 4.2.3) und im Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. 4.4.6.2). Da die Konzentration des F2-Fragments höher lag, kamen hiervon 100 µl und von F1 300µl in einer gemeinsamen Spur zur Auftrennung. Die proteinbeladene Membran wurde in 0,5 cm breite Streifen geschnitten, die in separaten Ansätzen mit den Antikörpern RGS-His (1:1000), dem Kaninchen-Präimmuns serum (1:250), dem Vollserum des immunisierten Kaninchens (1:250) sowie den

affinitätsgereinigten Antikörpern gegen F1 und F2 (Verdünnung jeweils 1:20) inkubiert wurden. Als Zweitantikörper dienten Peroxidase-gekoppelte Schwein-anti-Kaninchen Antikörper und im Falle des RGS-His Antikörpers ein Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Maus Antikörper, die jeweils in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt wurden.

In der Chloronaphtholfärbung zeigten die mit dem RGS-His-Antikörper und die mit dem Vollserum inkubierten Blotstreifen jeweils 2 Banden bei ca. 22 kDa und bei 17 kDa, die dem F2- bzw. F1-Fragment zugeordnet werden konnten (Abb. 5.9). Das Präimmunserum, das frei von spezifischen Antikörpern sein sollte, führte erwartungsgemäß nicht zu einer spezifischen Reaktion. Die mit den affinitätsgereinigten Antikörperfraktionen inkubierten Blotstreifen wiesen Anfärbungen für jeweils nur eine Bande bei 17 kDa, die dem pUL142-F1, oder bei 22 kDa, die dem pUL142-F2 entsprach, auf.

Es konnte somit der Nachweis erbracht werden, dass mit Hilfe affinitätsgereinigter Antikörper der N-terminale und der C-terminale Bereich des pUL142 getrennt voneinander spezifisch dargestellt werden konnten.



**Abb. 5.9 Überprüfung der affinitätsgereinigten Antikörper im Immunoblot**

Es wurden 200 µl des aufgereinigten Proteins pUL142-F1 und 70 µl des -F2 in einem 15 %igen SDS-Gel gemeinsam aufgetrennt, im Naßblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und diese in 0.5 cm breite Streifen geschnitten. Streifen 1 wurde mit einem RGS-His-AK (1:1000 inkubiert), Streifen 2 mit dem Präimmunserum und Streifen 3 mit dem Vollserum des immunisierten Kaninchens (jeweils 1:300). Der Streifen 4 wurde mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen pUL142-F1 und Streifen 5 mit dem gegen pUL142-F2 inkubiert. Nach Inkubation mit entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern (1:300) wurde eine Chloronaphtholfärbung durchgeführt. Die Molekulargewichtsangaben 22 und 17 kDa kennzeichnen die Positionen von pUL142-Fragment 2 bzw. 1.

#### **5.4 Versuche zur fluoreszenzimmunologischen Darstellung UL142-spezifischer Antigene in virusinfizierten humanen Fibroblasten**

Zur Überprüfung, ob und zu welchen Zeiten pUL142 möglicherweise in permissiven virusinfizierten Zellen nachweisbar ist, wurden Deckglaskulturen humaner Fibroblasten wie unter 4.3.5 beschrieben mit dem wildtypischen HCMV Toledo und zur Kontrolle mit dem attenuierten Laborstamm AD169 infiziert. Nach 24, 36, 48 72 und 96 h wurden Kulturen entnommen und wie in Material und Methoden beschrieben fixiert und fluoreszenzimmunologisch (4.4.3) untersucht. Die erfolgreiche Infektion konnte an Hand des HCMV-IE-Antigens, das sowohl von wildtypischen als auch attenuierten Virusstämmen exprimiert wird, nachgewiesen werden. Die Inkubation mit den affinitätsgereinigten Antikörpern gegen pUL142-F1- bzw. -F2 (s.5.3) führte demgegenüber nicht zu spezifischen Fluoreszenzsignalen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das UL142-Gen unter den gegebenen Bedingungen nicht auf Proteinebene exprimiert wird. Die geplanten Untersuchungen zur strukturellen Charakterisierung, z. B. zur Topologie des potentiellen Genprodukts des UL142 konnten aus diesem Grunde nicht durchgeführt werden.

#### **5.5 Testung von Patientenseren auf pUL142-spezifische Antikörper**

Unter den Bedingungen der Zellkultur erhaltene Ergebnisse lassen sich nur sehr begrenzt direkt auf die Situation im infizierten Organismus übertragen. Es ist durchaus vorstellbar, dass im menschlichen Organismus die Translation und somit die Antigenpräsentation ermöglicht wird aufgrund der vielfältigen Signale, die - im Gegensatz zur Situation der Zellkultur - wahrscheinlich auf infizierte Zellen einwirken. Das beschriebene Streifenblotverfahren wurde deshalb verwendet, um Patientenseren auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen pUL142 zu prüfen.

##### **5.5.1 Vergleich von HCMV-negativen und -positiven Seren**

Antikörper gegen bakterielle Antigene führen bei der Verwendung von prokaryotischen Antigenen auch im Blotverfahren mitunter zu unspezifischen Reaktionen. Aus diesem Grunde wurden zunächst die Reaktionen von Seren, die im Standard-Enzymimmunoassay (ELISA) negativ bzw. positiv für Antikörper gegen HCMV getestet worden waren, verglichen. Insgesamt wurden die Seren von 92 Patienten

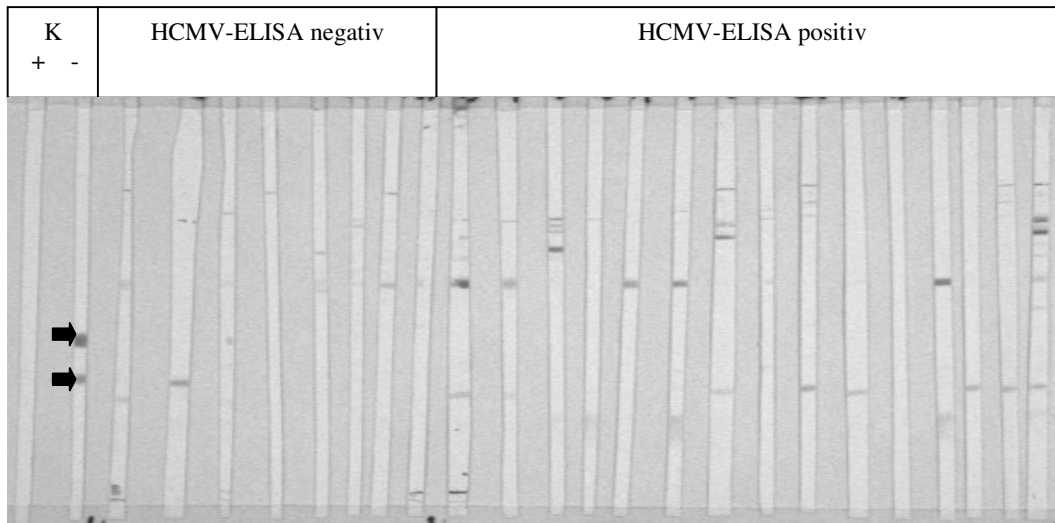
untersucht. Von diesen waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme 27 im HCMV-ELISA negativ, 65 waren in der Testung auf IgG und/oder IgM positiv.

Als Positivkontrolle wurde das Kaninchenserum (5.2.2.4) in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt, der darauf folgende Peroxidase-gekoppelte Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:300. Die Verdünnung der Patientenseren betrug 1:100, der entsprechende Kaninchen-anti-Human-IgG-Zweitantikörper wurde nach Herstellerangaben 1:300 eingesetzt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte jeweils ÜN bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch. Die Inkubationszeit der Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper betrug 2 h bei gleichen Bedingungen (s. 4.4.6.3).

Unter diesen Bedingungen war auf fast allen Blotstreifen eine Hintergrundreaktion in Form mehrerer Banden zu erkennen (Abb. 5.10). In verschiedenen Testläufen wurde sowohl mit negativen als auch positiven Seren u. a. eine Bande mit einem nur geringfügig niedrigeren Molekulargewicht als pUL142-F1 (17 kDa) erhalten. Insgesamt führten jedoch weder die HCMV-negativen noch die -positiven Seren zu spezifischen Anfärbungen der pUL142-Fragmente, die mit der der Positivkontrolle mit dem Immuns serum K414 vergleichbar gewesen wären.

In Abbildung 5.10 ist ein Set der durchgeführten Streifenblots beispielhaft dargestellt.





**Abb. 5.10: Testung von Patientenseren auf Antikörper gegen HCMV pUL142 im Streifenblotverfahren**

Unter K sind die Ergebnisse für das Kaninchen-Präimmunserum als Negativ- (-) und das Immunserum als Positivkontrolle (+) gezeigt. Unter *HCMV-ELISA negativ* sind die Ergebnisse mit den Proben von 8 seronegativen Patienten, und unter *HCMV-ELISA positiv* die Ergebnisse von 15 seropositiven Patienten. Das Kaninchenserum und die humanen Seren wurden in Verdünnungen von 1:200 bzw. 1:100 eingesetzt. Die entsprechenden Zweitantikörper wurden 1:300 verdünnt. Die Pfeile links markieren die Banden der Positivkontrollen für F1 und F2.

### 5.5.2 Untersuchung von Seren von Patienten mit einer HIV-Koinfektion

In immunkompromittierten Patienten ist bekanntermaßen sowohl die primäre als auch die reaktivierte HCMV-Infektion von großer klinischer Bedeutung. Es ist vorstellbar, dass eine Schwächung der Immunüberwachung als Folge einer therapeutischen oder durch einen Infektionserreger verursachten Immunsuppression Mechanismen, die im Gesunden die HCMV-Infektion kontrollieren, aufhebt. Im immunsupprimierten Organismus könnten somit z.B. pathogenitätsrelevante Gene des HCMV dereprimiert werden und die entsprechenden Genprodukte nicht nur die klinische Symptomatik auslösen, sondern auch als Antigene präsentiert werden.

Aus diesem Grunde wurden HCMV-ELISA-positive Seren von Patienten untersucht, die nachweislich eine Koinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) aufwiesen. Insgesamt standen für die Analyse im Streifenblot 9 Seren zur Verfügung, die alle Antikörper für HCMV-IgG und in 4 Fällen auch HCMV-spezifisches IgM enthielten. Vier der Seren zeigten in der Tat Reaktionen mit den rekombinanten pUL142-Fragmenten, allerdings schwächere als das Kontrollserum K414. (Abb.5.11). Interessanterweise reagierten alle vier der positiven Seren mit F1, jedoch nur zwei der

Seren zusätzlich mit F2. Ein Zusammenhang mit positiven IgM-Nachweisen im ELISA war nicht erkennbar.

In Tabelle 5.1 sind die mit Patientenseren erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

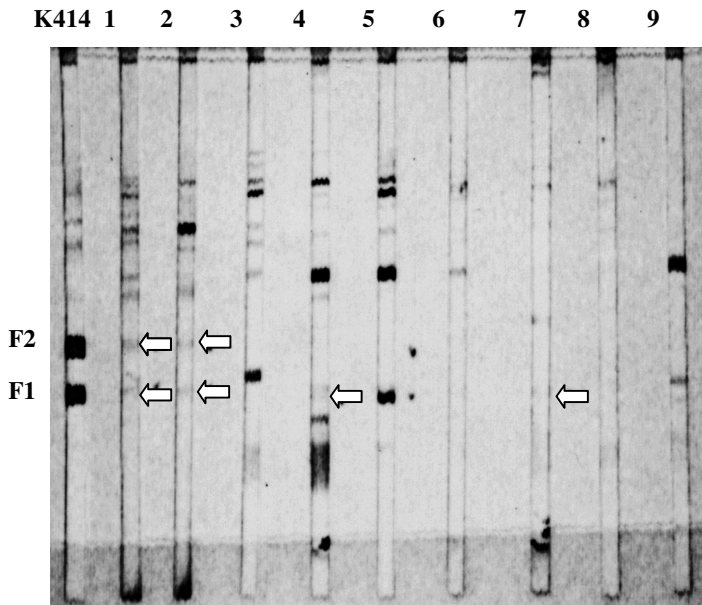


Abb. 5.11 Testung von Seren von Patienten mit einer HIV-Koinfektion im Streifenblotverfahren

Die Streifen 1-9 wurden mit Seren von Patienten inkubiert, die eine HCMV/HIV-Koinfektion aufwiesen. Das Kontrollserum K414 wurde 1:200, die humanen Seren 1:100 verdünnt. F1 und F2 markieren die vom Kaninchen-Kontrollserum erkannten Banden. Die weißen Pfeile in der Figur weisen auf von Patientenseren erkannte Banden.

<i>ELISA-Befund</i>	n	<i>Antikörper gegen F1</i>	<i>Antikörper gegen F2</i>
HCMV negativ	27	0	0
HCMV positiv	56	0	0
HCMV + HIV positiv	9	4	2
	92		

Tab 5.1: Reaktivität von Patientenseren mit den pUL142-Fragmenten F1 und F2 im Streifenblotverfahren

## 6. Diskussion

Der offene Leserahmen UL142 ist in einem Genomfragment mit ca. 20 ORFs (UL131-155) lokalisiert, die wildtypische HCMV-Stämme im Vergleich zu den etablierten an Zellkulturen adaptierten Laborstämmen als zusätzliche genetische Information aufweisen. Da wildtypische Stämme im Gegensatz zu den adaptierten Humanpathogenität besitzen, ist nicht auszuschließen, dass diese zusätzlichen ORFs pathogenitätsrelevant sind.

Der aus diesem Genombereich bisher ausschließlich untersuchte ORF UL144 zeigt eine auffällige Sequenzhypervariabilität (Lurain et al, 1999). Es ließ sich allerdings zwischen klinischem Verlauf der Erkrankung und typischen Sequenzvarianten kein eindeutiger Zusammenhang herstellen. Bei dem Genprodukt des ORF UL144 handelt es sich um ein potentiell Glycoprotein, das eine Strukturhomologie zum Herpes simplex virus entry mediator (HVEM) besitzt. Ein derartiges Protein könnte im Rahmen einer Infektion als Rezeptor eine Rolle spielen, z. B. für Signale, die den Ablauf des Infektionszyklus entscheidend modulieren und sich somit u. U. auf die Pathogenität auswirken könnten. Neben ORF 144 enthält der wildtypische Genomabschnitt zehn weitere ORFs, die für potentielle Glykoproteine kodieren, zu denen auch der ORF UL142 gehört (Lurain et al, 1999). Mit Hilfe des Strukturvorhersageprogramms HUSAR ergibt sich für die deduzierte Aminosäure-sequenz des pUL142 ein Glykoprotein mit 20 Glykosylierungs- und fünf Myristilierungsstellen. Bei der hier durchgeführten in vitro-Analyse ließ sich diese Vorhersage hinsichtlich des Glykosylierungsstatus jedoch nicht bestätigen.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte eine Expression von pUL142 in infizierten humanen Zellen zwar auf Transkriptions- jedoch nicht auf Translationsebene beobachtet werden. Eine UL142-spezifische mRNA wurde nach 24-96 h in transient transfizierten Zellkulturen detektiert (Schmitz, 2000). Auch in HCMV-infizierten Zellen gelang mittels Reverse Transcriptase-PCR der Nachweis einer mRNA, bei der es sich offenbar um ein spät im Infektionszyklus auftretendes und eventuell verkürztes Transkript handelte (Dittmer, 2002). Auf Translationsebene konnte in transfizierten eukaryotischen Zellen mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass rekombinantes pUL142 exprimiert wird und im ER, nicht aber an der Zelloberfläche oder im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Dieser Nachweis ließ sich in einer vorangehenden (Dittmer, 2002) ebenso wie in der vorliegenden Arbeit in HCMV-infizierten permissiven Kulturzellen nicht verifizieren. Hier muß neben der Möglichkeit, dass das pUL142 in

HCMV-infizierten Kulturzellen in der Tat nicht exprimiert wird, in weiterführenden Versuchen geklärt werden, ob die zum immunologischen Nachweis eingesetzten Antikörper einschließlich des Immunsersums K414 für eukaryotisch exprimiertes UL142 ein ungeeignetes experimentelles Instrument darstellen (s. auch unten).

Im Rahmen der Promotionsarbeit von M. Bergmann (2003) konnte durch gezielte Untersuchungen an mehr als 20 HCMV-Frischisolaten eine Sequenzhypervariabilität auch für den ORF UL142 nachgewiesen und unterschiedliche Genotypen definiert werden. Eindeutige Korrelationen der Genotypen zum klinischen Phänotyp ließen sich jedoch ebensowenig wie beim UL144 erkennen.

In dieser Arbeit sollte als weiterer Schritt zur Klärung der potentiellen Funktion die Immunogenität des Genproduktes des ORF UL142 durch die Untersuchung von Patientenseren geprüft werden. Hier diente der Peptid-Antikörper K414, der auch für die Experimente zur Expression in infizierten Zellen verwendet wurde, als Positivkontrolle für die serologischen Analysen. Weiterhin wurde das pUL142 in zwei Fragmenten prokaryotisch exprimiert, die im Immunoblotverfahren als Antigene eingesetzt wurden.

Für die Herstellung des spezifischen Antikörpers gegen pUL142 im Kaninchen (K414) waren zwei potentiell antigene Sequenzbereiche (Aminosäuren 84-98 und 297-306 der deduzierten Sequenz) verwendet worden, die amino- bzw. carboxyterminal im potentiellen Protein lokalisiert sind. Aus dem gewonnenen Immunsorum konnten mittels Affinitätsreinigung unter Verwendung der getrennt exprimierten Fragmente F1 und F2, die den amino- bzw. carboxyterminalen Bereich des pUL142 abdecken, Fragment-spezifische Antikörper dargestellt werden.

Sowohl das Vollserum K414 als auch die affinitätsgereinigten Fraktionen führten zu hintergrundfreien Anfärbungen der pUL142-Fragmente im Immunoblot. Dies stand im relativen Gegensatz zu den Resultaten bei der Verwendung von Patientenseren. Die Vielfalt unspezifischer Anfärbungen von Banden, die außerhalb der Molekulargewichtsbereiche der pUL142-Fragmente liegen, ist wahrscheinlich dadurch verursacht, dass die für den Immunoblot verwendeten Antigenfraktionen nicht frei von weiteren kontaminierenden bakteriellen Proteinen waren, die mit den in Patientenseren häufig vorhandenen antibakteriellen Antikörpern reagierten. Trotz dieser unspezifischen

Reaktionen kann davon ausgegangen werden, dass in Seren nicht immunsupprimierter HCMV-infizierter Patienten spezifische Antikörper gegen die verwendeten rekombinanten pUL142-Fragmente nicht nachweisbar waren. Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, dass unter den verwendeten Bedingungen nur Antikörper gegen lineare Epitope erfasst werden, nicht dagegen konformationsabhängige, deren Nachweis aufwändigere Techniken erfordert.

Demgegenüber konnten spezifische Antikörper gegen pUL142 in vier der neun hier untersuchten Seren von Patienten mit einer HIV-Koinfektion nachgewiesen werden. Das hier untersuchte Kollektiv war klein und die Beobachtung muss in zukünftigen Untersuchungen an größeren Serien geeigneter Seren bestätigt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse waren jedoch reproduzierbar und können als gesichert gelten.

Wie im Ergebnisteil (5.5.2) bereits angemerkt wurde, ist es durchaus vorstellbar, dass im immunsupprimierten Organismus aufgrund der veränderten Regulationslage eine Induktion von Genen des wildtypischen Genomabschnitts erfolgt, die entsprechenden Genprodukte präsentiert werden und eine nachweisbare humorale Immunreaktion ausgelöst werden kann. Diese Vorstellung wird durch Berichte gestützt (Koval V, Spector SA et al, 1995), in denen gezeigt wird, daß im Falle einer HIV/HCMV Koinfektion die Promotoren regulatorischer Proteine im Genom des HIV-I durch sogenannte sehr frühe Genprodukte des HCMV induziert werden. Ein Einfluß von HIV-Genprodukten auf die Regulation der Genexpression in HCMV-infizierten Zellen ist bisher nicht beschrieben worden, aber durchaus denkbar.

Vor diesem Hintergrund stellt sich zum einen die Frage, warum nicht in allen Seren von HIV-Koinfizierten pUL142-spezifische Antikörper nachweisbar waren, und zum anderen, warum unter den verwendeten Bedingungen häufiger Antikörper gegen Fragment F1 als gegen –F2 gefunden wurden. Hinsichtlich der ersten Frage bieten die in einer vorangegangenen Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen des UL142-Gens von frischen HCMV-Isolaten (M. Bergmann, 2003) eine mögliche Erklärung. Die im Vergleich zur publizierten Sequenz des Stammes Toledo festgestellten Hypervariabilitäten führen in der deduzierten Aminosäuresequenz zu Substitutionen, die die Antigenität verändern und die Ursache dafür sein könnten, dass die induzierten Antikörper das hier im Immunoblot verwendete Toledo-spezifische Antigen nicht mehr erkennen können. Diese Vorstellung könnte experimentell z.B. dadurch überprüft werden, dass im Immunoblot statt des Toledo-Antigens pUL142-Produkte von HCMV-

Frischisolaten und gleichzeitig die Seren der HIV-koinfizierten Patienten verwendet werden, von denen die HCMV-Isolate gewonnen wurden.

Die dennoch häufigere Erkennung des Fragments 1 durch die Seren von HIV-Koinfizierten war überraschend, zumal das Antigen wegen der geringeren Expressionseffizienz (5.2.2.3) meist in etwas niedrigerer Konzentration im Immunoblot eingesetzt wurde. Im Hinblick darauf, dass in vorangehenden Untersuchungen in HCMV-infizierten Zellen eine am 3'-Ende um etwa 270 bp verkürzte UL142-spezifische mRNA identifiziert wurde (A. Dittmer, 2002), könnte eine Erklärung sein, dass in vivo Genprodukte mit einer Deletion am Carboxyterminus entstehen und infolgedessen keine Fragment 2-spezifischen Antikörper bzw. nicht von allen HCMV-Wildtypen induziert werden. Weiterhin könnte in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein, welche Epitope des pUL142 in vivo für die Antigenpräsentation und somit Induktion der humoralen Immunantwort ausgewählt werden. Informationen zu diesem Aspekt liegen bisher nicht vor. Es kann nicht davon ausgegangen werden, daß die für die Herstellung des Immunsersums im Kaninchen verwendeten Epitope auch im Menschen relevant sind. Dieser Punkt ließe sich jedoch durch Wettbewerbsversuche im Immunoblotverfahren unter Verwendung geeigneter Seren von HIV-Koinfizierten und des Kaninchenserums K414 überprüfen.

## 7. Zusammenfassung

Klinische Isolate und wildtypische Laborstämme des Humanen Cytomegalievirus (HCMV), wie zum Beispiel der Stamm Toledo, weisen im Vergleich zu den an Kulturzellen adaptierten Stämmen einen zusätzlichen Genombereich von etwa 20 offenen Leserahmen auf, zu dem auch der ORF UL142 gehört. Da HCMV-Isolate im Gegensatz zu den adaptierten Laborstämmen humanpathogen sind, könnten die zusätzlichen Gene für die Pathogenität des HCMV im Menschen von Bedeutung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mittels eines *in vitro*-Translationsverfahrens gezeigt, dass das Genprodukt des ORF UL142 (pUL142) unter den gegebenen Bedingungen nicht glykosyliert wird. Zur Etablierung eines serologischen Nachweisverfahrens wurde einerseits als Kontrollantikörper ein Peptidserum im Kaninchen gegen definierte potentiell antigene Aminosäuresequenzen im aminoterminalen (AS 84-98) und carboxyterminalen (AS 297-306) Bereich des Proteins generiert. Weiterhin wurden mittels prokaryotischer Expression zwei Proteinfragmente hergestellt, die dem aminoterminalen (AS 1-153) bzw. carboxyterminalen (AS 153-306) Abschnitt des pUL142 entsprachen. Diese rekombinanten Proteine wurden zur Affinitätsreinigung fragmentspezifischer Antikörper aus dem Peptidvollserum verwendet. In infizierten Fibroblastenzellen konnte eine Expression des pUL142 mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung dieser Peptidantikörper nicht nachgewiesen werden.

Die rekombinanten Proteine dienten weiterhin als Antigen für die Etablierung eines Immunoblotverfahrens zum Nachweis pUL142-spezifischer Antikörper in Humansenen. Es wurden insgesamt 65 Seren, die von seropositiven Individuen stammten, untersucht. Neun der Seren stammten von Patienten, die eine HIV-Koinfektion aufwiesen. Spezifische Antikörper gegen pUL142 konnten unter den verwendeten Bedingungen nur in vier der HIV-positiven Seren nachgewiesen werden. Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Expression und/oder Immunogenität des pUL142 durch eine HIV-Koinfektion induziert wird.

## 8. Literaturverzeichnis

Bello C, Whittle H. 1991. Cytomegalovirus infection in gambian mothers and their babies. *J Clin Pathol.* 44:366-9.

Benedict CA et al. 1999. A novel viral TNF Receptor Superfamily Member in Virulent Strains of Human Cytomegalovirus. *J Immunology.* 162:6967-6970

Bergmann M. 2003. Untersuchung zur Primärstruktur eines potentiellen Glykoproteins des humanen Cytomegalievirus. Dissertation im Fach Zahnmedizin. Philipps-Universität: Marburg

Bogner E. 1999. Human Cytomegalovirus (HCMV) nuclease: implications for new strategies in gene therapy. *Gene Ther and Mol Biol.* 3:75-8.

Bogner E, Radsak K, Stinski MF. 1998. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol.* 72:2259-64.

Bogner E, Reschke M, Reis B, Mockenhaupt T, Radsak K. 1993. Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus genome. *Virology.* 196:290-3.

Bogner E, Reschke M, Reis B, Reis E, Britt W, Radsak K. 1992. Recognition of compartmentalized intracellular analogs of glycoprotein H of human cytomegalovirus. *Arch Virol.* 126:67-80.

Bold S, Ohlin M, Garten W, Radsak K. 1996. Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B- mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol.* 77:2297-302.

Britt WJ. 1996. Vaccines against human Cytomegalovirus: Time to test. *Trends in Microbiology.* 4(1):34-38.

Britt WJ, Pass RF, Stagno S, Alford CA. 1991. Pediatric Cytomegalovirus infection. *Transplant Proc.* 23 Suppl. 3, 115-7.

Britt WJ, Alford CA. 1996. Cytomegalovirus. Fields BN, Knipe DM et al (editors). *Virology.* 3<sup>rd</sup> Edition, raven Press NY. Chapter 70.

Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol.* 70:78-83.

Chandler SH, McDougall SK. 1986. Comparison of restriction site polymorphisms among clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 67:2179-92.



- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 266:1865-9.
- Chee M, Rudolph SA, Plachter B, Barrell B, Jahn G. 1989. Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus. *J Virol*. 63:1345-53.
- Chee M, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Hornsneel T, Hutchinson I, Kouzarides T, Martignetti J, Preddie E, Satchwell S, Tomlison P, Weston K, Barrell B. 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of Human Cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*. 154:125-169.
- Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. 1992. Human Cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*. 191:387-95
- Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*. 193:834-41.
- de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. 1998. Summary of the II International Symposium of Cytomegalovirus. *Antiviral Res*. 39(3):141-62
- Demmler GJ. 1991. Infectious diseases society of america and centersdisease contro. Summary of a surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis*. 13:315-29.
- Doerr HW. 1987. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Virol Methods*. 17(1-2):127-32.
- Eggers M, Radsak K, Enders G, Reschke M. 2001. Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Med Virol*. 2001 Feb;63(2):135-42.
- Elek SD, Stern H. 1984. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet*. 1-5.
- Epstein MA, Henle G, Achong B, Barr YM. 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured Lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*. 121:761-70.
- Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. 2000. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: Implications for transmission and pathogenesis. *J of Virol*. 74:6808-20
- Fishman JA, Rubin RH. 1998. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 338:1741
- Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 87:748-52.

- Geballe AP, Leach FS, Mocarski ES. 1986. Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *J Virol.* 57:864-74.
- Glenn, J. 1981. Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev Inf Dis.* 3:1151-78.
- Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. 1989. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA.* 261(24):3561-6
- Grundy JE, McKeating JA, Ward PJ, Sanderson AR, Griffiths PD. 1987. Beta 2 microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor. *J Gen Virol.* 68:793-803.
- Griffiths PD. 2002. The treatment of cytomegalovirus infection. *Journal of Antimicrobial Therapy.* 49:243-53
- Gupta P, St Geor S, Rapp F. 1977. Comparison of polypeptides of several strains of Human Cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 34:447-54
- Heilbronn R, Jahn G, Burkle A, Freese UK, Fleckenstein B, zur Hausen H. 1987. Genomic localization, sequence analysis, and transcription of the putative human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol.* 61:119-24.
- Hemmings DG, Kitani R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert LJ. 1998. Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *J Virol.* 72:4970-9
- Hinkle AM, Lee JA, Bell KA, Hsu S. 2000. A review of antiviral therapies in the treatment of cytomegalovirus. *Dermatologic Therapy.* 13:269-276
- Huang ES, Chen ST, Pagano JS. 1975. Human Cytomegalovirus. Purification and Characterisation of viral DNA. *J of Virol.* 12:1473-81.
- Keay JF, Gompels UA, Minson AC. 1992. Glykoprotein H of Human Cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL 115 gene product. *J Gen Virol.* 65:5124-28.
- Kovacs A, Schluchter M, Easley K, Demmler G, Shearer W, La Russa P, Pitt J, Cooper E, Goldfarb J, Hodes D, Kattan M, McIntosh K. 1999. Cytomegalovirus infection and HIV-1 disease progression in infants born to HIV-1-infected women. Pediatric Pulmonary and Cardiovascular Complications of Vertically Transmitted HIV Infection Study Group *N Engl J Med* 341 (19): 1476-7
- Krech U. 1973. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world *Bull health Organ* 49(1):103-6
- Kumar ML, Nankervis GA. 1979. Cytomegalovirus infections *South Med J.* 72(7):854-61

- Landini MP, Spaete RR. 1993. Human Cytomegalovirus structural proteins: A report of the first nomenclature workshop in: Michelson, S. and Plotkin, S.A. (eds.): Multidisciplinary approach to understanding Cytomegalovirus disease, Elsevier, Amsterdam. 65-74
- Lipitz S, Achiron R, Zalel Y, Mendelson E, Tepperberg M, Gamzu R. 2002. Outcome of pregnancies with vertical transmission of primary cytomegalovirus transmission. *Obstet Gynecol.* 100(3):428-33
- Lurain NS, Tatarowicz W, Read G, Thompson K. 1989. Characterisation of mutants of human cytomegalovirus resistant to Ganciclovir. Abstract presented at the Second International Cytomegalovirus Workshop, Univ. of California, San Diego, USA.
- Lurain NS, Kapell KS, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, Benedict CA, Ware CF, Bremer JW. 1999a. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J Virol.* 73:10040-50.
- MacCormac LP, Grundy JE. 1999. Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains. *J Med Virol.* 57:298-307.
- Mandell GL et al. (editors). 1995. Principle and Practice of Infectious Diseases. 4<sup>th</sup> Edition. Churchill Livingstone, NY
- Maskolini M. 1996. CMV resistance: "More complicated than we thought" *J Int Assoc Physicians Aids Care.* 2:37-9
- Matthews T, Boehme R. 1988. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis.* 10 suppl 3:490-4 Review
- Mc Voy MA, Adler SP. 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol.* 68:1040-51
- Meyer GA, Radsak K. 2000. Identification of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem.* 275(6):3857-66.
- Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. 1986. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis.* 153:478
- Modrow S, Falke D. 1997 Herpesviren 411-463.in Modrow S (ed) et al., Molekulare Virologie, erste Auflage, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. 1993. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology.* 197:143-58.

- Nowak B, Gmeiner A, Sarnow P, Levine AJ, and Fleckenstein B. 1984. Physical mapping of human cytomegalovirus genes: identification of DNA sequences coding for a virion phosphoprotein of 71 kDa and a viral 65- kDa polypeptide. *Virology*. 134:91-102.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*. 20:4922-31
- Oram RJ, Herold BC. 1998. Antiviral agents for herpes viruses. *Pediatr Infect Dis J*. 17:652-3
- Pannuti CS, Vilas Boas LS, Angelo MJ, Amato Neto V, Levi GC, de Mendonca JS, de Godoy CV. 1985. Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. *Scand J Infect Dis*. 17(2):153-6.
- Plotkin SA. 2001. Vaccination against cytomegalovirus. *Arch Virol Suppl*. (17):121-34
- Plotkin SA, Farquhar J, Horberger E. 1976. Clinical trials of immunisation with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J Infect Dis*. 134:470-5
- Quinnan GV Jr., Delery M, Rook AH, Frederick WR, Epstein JS, Manischewitz JF, Jackson L, Ramsey KM, Mittal K, Plotkin SA et al. 1984. Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med*. 101:478-83.
- Radsak K, Brucher KH, Britt W, Shiou H, Schneider D, Kollert A. 1990. Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology*. 177:515-22.
- Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hubinger A, and Reschke M. 1996. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol*. 141:557-72.
- Radsak K, Kern H, Reis B, Reschke M, Mockenhaupt T, Eickmann M. 1995. Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins. in: Friedman, H. and Barbanti-Brodano, G. (eds.): DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms., Plenum Press, N.Y.. 295-312
- Reschke M, Reis B, Noding K, Rohsiepe D, Richter A, Mockenhaupt T, Garten W, Radsak K. 1995. Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J Gen Virol*. 76:113-22.
- Roizmann B, Batterson W. 1985. Herpesviruses and their replication. in: Fields, B.N.; Knipe, D.M. et al. (eds.). *Virology*, Vol.2, 2<sup>nd</sup> Edition, Raven Press , N.Y., 1795-894
- Roizmann, B, Carmichael LE, Deinhardt F, De-The G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K. 1981. Herpesviridae definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology*. 16:201-17.

Rubin RH, Kemmerly SA, Conti D, Doran M, murray BM, Neylan JF, Pappas C, Pitts D, Avery R, Pavlakis M, Del Busto R, De Nofrio D, Blumberg EA, Schoenfeld DA, Donohue T, Fisher SA, Fishman JA. 2000. Prevention of primary cytomegalovirus disease in organ transplant recipients with oral ganciclovir or oral aciclovir prophylaxis. *Transpl Infect Dis.* 2:112-7

Sambrock J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y..

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.

Schmitz H. 2000. Expression und Charakterisierung eines neuen potentiellen Glykoproteins von wildtypischem Cytomegalievirus. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität: Marburg

Schmitz H, Strive T, Bergmann M, Meyer G, Johannsen B, Schreiber T, Gicklhorn D, Eickmann M, Radsak K. 2001. Strukturelle Charakterisierung und Expression des ORF UL142 von wildtypischem HCMV. *GfV Dresden*.

Schneeweis KE. 1962. Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z Immunitätsforsch Exp Ther.* 124:24-48.

Schreiber T. 2002. Transkription und Translation eines nicht essenziellen Gens (UL142) von wildtypischem Cytomegalievirus des Menschen. *Diplomarbeit im Fach Biologie*. Philipps-Universität: Marburg

Smith MG. 1956. Propagation in tissue cultures of a cythopathogenic virus from human Salivary Gland Virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol.* 92:424-430.

Smuda C, Bogner E, Radsak K. 1997. The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle. *J Gen Virol.* 78:1981-92.

Sodeik B, Ebershold MW, Helenius A. Mikrotubule and Dynein mediated transport of incoming HSV-1 capsids to the nucleus. *Poster Nr.174: International Herpesvirus Workshop*, Netherlands, 1996.

Spaete RR, Mocarski ES. 1985a. The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J Virol.* 54:817-24.

Spaete RR, Mocarski ES. 1985b. Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans-activated by viral functions in permissive human fibroblasts. *J Virol.* 56:135-43.

Stinski MF. 1990. Cytomegalovirus and its replicatin. in: *Fields*, B. N.; D.M. Kniepe et al. (eds.): *Virology*, Vol.2, 2<sup>nd</sup> Edition, Raven Press, N.Y., 1959-81

Stinski MF, Thomsen DR, Stenberg RM, Goldstein LC. 1983. Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol.* 46:1-14.

Tooze J, Holinshead M, Reis B, Radsak K, Kern H. 1993. Progeny vaccinia and Human Cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol.* 60:163-78.

Van der Meer JTM, Drew W, Bowden R, Galasso GJ, Griffiths PD, Jabs D, Katlama L, Spector SA, Whitley R. 1996. Summary of the international consensus Symposium on advances in the diagnosis, treatment and the prophylaxis of cytomegalovirus infection. *Antiviral Research.* 32:119-40

Wathen, M.W., and M.F. Stinski. 1982. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol.* 41:462-77.

Wright HT Jr, Gooheart CR, Lielansis A. 1964. Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virol.* 23:419-24

Yen-Liebermann B. 2000. Diagnosis of human cytomegalovirus disease. *Clin Microbiol Newsl.* 22:105-9

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrom
Amp; <i>Amp<sup>r</sup></i>	Ampicillin, resistent gegen Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CPE	Cytopathischer Effekt
C-terminal	Carboxy-terminal
Dabco	1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbeccos minimales, essentielles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylidiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
gB	Glykoprotein B des HCMV
gp	Glykoprotein
GFP	green fluorescent protein
HA	Hämagglutinin
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus

---

h.p.i.	Stunden nach Infektion
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
HVEM, HveA	Herpes simplex-Virus „entry mediator“
IU	infektiöse Einheiten
IE	Immediate Early-Protein des HCMV
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IR	internal repeat
<i>Kan<sup>r</sup></i>	Kanamycinresistenz
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
mA	Milliampere
mab	Monoklonaler Antikörper
MIEP	HCMV- major immediate early promotor
ml	Milliliter
mM	millimolar
m.o.i.	multiplicity of infection
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Neo<sup>r</sup></i>	Neomycinresistenz
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	offener Leserahmen
ori	origin of replication
p	Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
pH	potentia hydrogenii



---

pp	Phosphoprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TR	terminal repeat
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit
ÜN	über Nacht
UL	unique long
US	unique short
UV	Ultraviolette Licht
V	Volt
VT	Volumenanteil
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 9.2. Buchstabencode der gängigen Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

### 9.3. Nukleotidsequenz des UL 142 des HCMV-Stammes Toledo (Cha et al., 1996)

```

                                atg cggattgaat ggggtgtggtg gttattcgga
                                tac gcctaactta cccacaccac caataagcct

6481 tacttttgtgt catccgttgg gagcgaacgg tcattatcct atcgttacca cttggaatct
    atgaaacaca gtaggcaacc ctcgcttgcc agtaatagga tagcaatggt gaaccttaga

6541 aattcatcta ccaacgtggt ttgcaacgga aacattttccg tgttttgtaaa cggcaccccta
    ttaagtagat gggtgcacca aacgttgcct ttgtaaaggc acaaacattt gccgtgggat

6601 ggtgtgcggt ataacattac ggtaggaatc agttcgtctt tattaatagg acaccttact
    ccacagcca tattgtaatg ccataccttag tcaagcagaa ataattatcc tgtggaatga

6661 atacaagtat tggaatcatg gttcacaccc tgggtccaaa ataaaagtta caacaaacaa
    tatgttcata accttagtac caagtgtggg acccaggttt tattttcaat gttgtttggt

6721 cccctaggtg aactgaaac gctttataat atagatagcg aaaacattca tcgcgtatct
    ggggatccac tgtgactttg cgaaatatta tatctatcgc ttttgtaagt agcgcataga

6781 caatattttc acacaagatg gataaaatct ctgcaagaga atcacacttg cgacctcaca
    gttataaaaag tgtgttctac ctattttaga gacgttctct tagtgtgaac gctggagtgc

6841 aacagtacac ctacctatac atatcaagta aacgtgaaca acacgaatta cctaacacta
    ttgtcatgtg gatggatatg tatagttcat ttgcacttgt tgtgcttaat ggatttgtat

6901 acatcctcgg gatggcaaga cgtctaaat tacaccgtca taaatagtag acactttaac
    ttaggagcc ctaccgttct ggcagattta atgtggcagt atttatcatg tgtgaaattg

6961 ctacagaaat cgaacataac cagcattcaa aaatatctca aactacctg catagaaaga
    gagtgtctta gcttctattg gtcgtaagtt tttatagagt tgtgatggac gtatctttct

7021 ctccgtaact acaccttgga gtccgtatac accacaactg tgccctcaaaa cataacaaca
    gaggcattga tgtggaacct caggcatatg tgggtgttgac acggagtttt gtattgttgt

7081 tctcaacacg caacaaccac tatgcacaca atacctcaa atacaataac aattcaaaat
    agagtgtgc gttgttggtg atacgtgtgt tatggagggt tatgttattg ttaagtttta

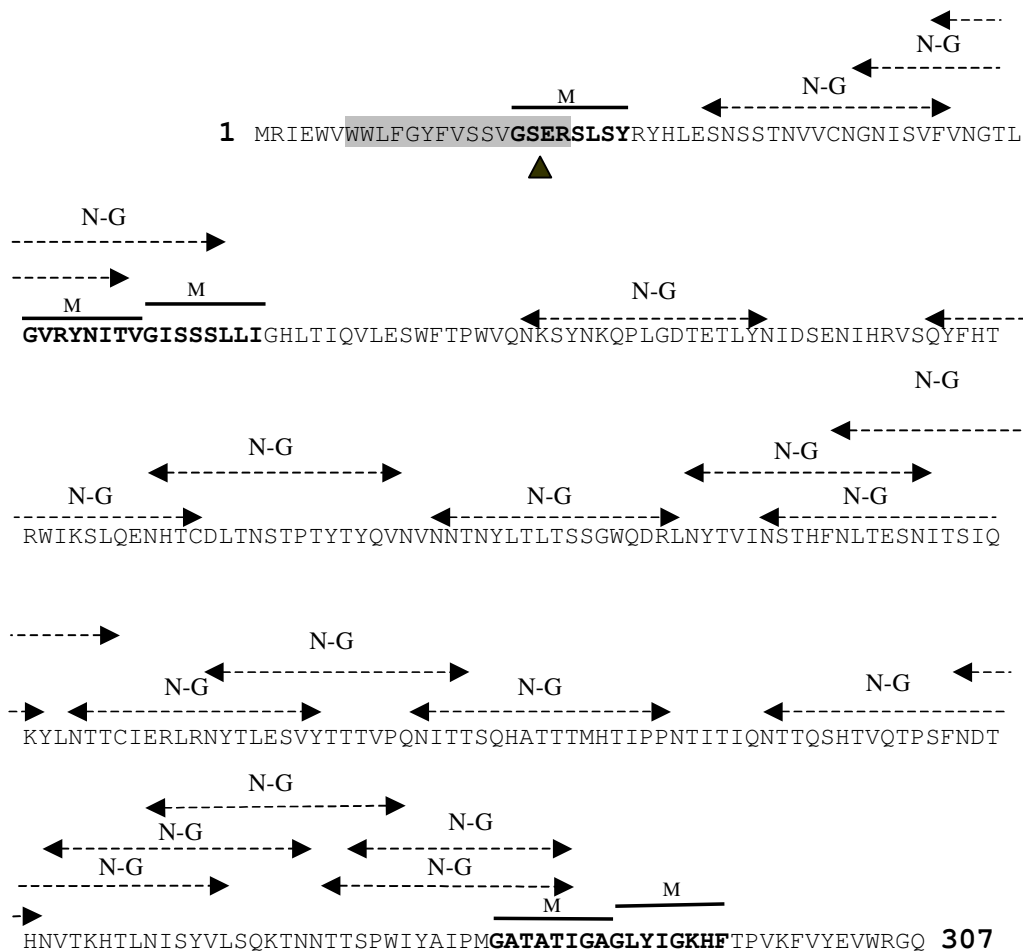
7141 acaactcaaa gccatactgt acagacgccc tcttttaacg acacacataa cgtgacgaaa
    tgttgagttt cgggtatgaca tgtctgoggc agaaaattgc tgtgtgtatt gcaactgctt

7201 cacacgttaa acataagcta cgttttatca caaaaaacga ataacacaac atcacctgtg
    gtgtgcaatt tgtattcgat gcaaaaatagt gttttttgat tattgtgttg tagaggcacc

```

#### 9.4. Deduzierte AS-Sequenz des UL 142 des HCMV-Stammes Toledo (Cha et al., 1999)

Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind mit gestrichelten Doppelpfeilen gekennzeichnet (N-G). Potentielle Myristylierungsstellen sind fett gedruckt und mit schwarzen Balken markiert (M). Das potentielle Signalpeptid, das mittels HUSAR (siehe Kap. 4.5) identifiziert wurde, ist durch den grauen Balken hervorgehoben. Die vorhergesagte Schnittstelle wird durch das schwarze Dreieck angedeutet.



## **Verzeichnis der Akademischen Lehrer**

Die folgenden Damen und Herren Professoren und Dozenten waren meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg:

Aumüller, Austermann, Cetin, Dibbets, Feuser, Flores de Jacoby, Folz, Gente, Hasilik, Hochban, Jungclas, Kern, Lehmann, Lotzmann, Mengel, Mittag, Pieper, Radsak, Ramaswamy, Stachniss, Steininger, Stelzel, Weihe, Wenz, Werner, Wisser

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Radsak für die Bereitstellung des interessanten Themas und die überaus engagierte Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit bedanken.

Dr. Dorothee Gicklhorn und Dr. Grit Meyer danke ich dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für Probleme hatten und mir stets mit gutem Rat zur Seite standen.

Prof. Dr. Garten möchte ich für die Hilfestellung bei Proteinchemischen Fragen danken.

Allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Radsak danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Dr. Maren Bergmann möchte ich für ihre Freundschaft und ihre moralische Unterstützung in Prüfungsphasen und im Rahmen meiner Promotion danken.

Nicht zuletzt gilt ein sehr großer Dank meinen Eltern für die großzügige Ermöglichung meines Studiums. Sie ließen mir stets größtmögliche Unterstützung zukommen und standen mir stets bei Problemen aber auch freudigen Begebenheiten zur Seite.